

**Zur Kenntniss der Inhaltsstoffe
von *Prunus spinosa* L.**

Karl Fuchs

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Prunus spinosa L.

und einiger Rosaceenarten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Karl Fuchs

aus

Langquaid/Ndb.

Juli 1959



5349/60

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. B a m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 13 XI 59

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Einleitung	1
Allgemeiner Teil	3
A. Bisherige Untersuchungen der Blüten von <i>Prunus spinosa</i> L.	3
B. Eigene Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonen in den Blüten von <i>Prunus spinosa</i> L.	3
I. Isolierung der Flavone aus <i>Flores Pruni spinosae</i> (<i>Flores Acaciae</i>)	3
II. Identifizierung der gefundenen Flavone	8
1) Identifizierung der aus der Droge isolierten Aglykone	8
2) Identifizierung der Glykoside	9
C. Nachisolierung und Identifizierung des Hauptglykosides aus den Blättern von <i>Prunus spinosa</i> L. ..	22
I. Bisherige Bearbeitung	22
II. Vereinfachte Isolierung des Hauptglykosides aus den Blättern von <i>Prunus spinosa</i> L.	24
III. Identifizierung des aus den Blättern von <i>Prunus spinosa</i> L. nachisolierten Hauptglykosides als Kämpferol-3,7-dirhamnosid	25
IV. Hydrolyse der Mutterlaugen des Glykosides	27
D. Untersuchung der Infrarotspektren einiger Kämpferolabkömmlinge	28
E. Papierchromatographische Untersuchungen über die Flavonführung der bekanntesten Rosaceen	35
F. Untersuchungen über das Vorkommen von freien Zuckern in den Blüten von <i>Prunus spinosa</i> L.	42
G. Untersuchung der im UV-Licht blau fluoreszierenden Stoffe aus den Blüten von <i>Prunus spinosa</i> L. .	44

Experimenteller Teil	47
A. Papierchromatographie	47
B. Bereiten des wäßrigen Extraktes	48
C. Ausschüttelung mit Äthergemischen	50
D. Ausschüttelung mit Essigester-Methanol-Gemischen	51
E. Ausschüttelung der Extrakte für die systematische Übersicht	51
F. Isolierung der Glykoside und Aglykone mit Hilfe der Säulenchromatographie	52
G. Die zur Identifizierung der Flavone durchgeführten Versuche	58
H. Hydrolysen	63
I. Identifizierung der Aglykone	65
K. Versuche zur Identifizierung der Zuckerkomponenten	67
L. Vereinfachte Isolierung des Hauptglykosides aus Folia Pruni spinosae	70
M. Sprühreagenzien zur Charakterisierung der im UV-Licht blau fluoreszierenden Stoffe	72

Einleitung

Jahrelange Bemühungen um die Aufklärung der physiologischen Wirkung der Flavone sind zu einem vorläufigen Ergebnis gekommen. Es scheint als sicher zu gelten, daß Flavone¹⁾, daneben aber auch Katechine²⁾ und andere phenolische Stoffe, als "Sauerstoffakzeptoren" fungieren und dadurch leicht oxydable Stoffe, wie z. B. das Adrenalin, vor Oxydation schützen können. Hierbei gehen sie selbst in Chinone oder höhermolekulare Kondensationsprodukte über.

Da Adrenalin und sein Gegenspieler, das Histamin, die Kapillarverengung und -erweiterung regulieren, würde eine verzögerte Oxydation³⁾⁴⁾⁵⁾ einem längeren Verbleiben des Adrenalins im Blute gleichkommen und dadurch zur Verengung bzw. Abdichtung der Gefäße führen⁶⁾. Diese Theorie wurde schon früher zur Erklärung der Vitamin-P-Wirkung der Flavone herangezogen.

Wenn die bisher gegenüber Adrenalin und Ascorbinsäure nachgewiesene Schutzfunktion zu Recht besteht, ist anzunehmen, daß sie auch bei anderen Verbindungen, z. B. den cardiotropen Glykosiden, wirksam wird. R. REPKE⁷⁾ hat gefunden, daß Digitalisglykoside erst nach vorausgegangener Hydroxylierung ausgeschieden werden. Durch den Zusatz von Flavonen würde die Oxydation der herzwirksamen Glykoside verzögert, so daß sie durch längeres Verbleiben im Organismus eine verstärkte Wirkung entfalten könnten.

-
- 1) LAVOLLAY, J.: C.R.Séances Soc.Biol.Filiales 135, 1193 (1941)
 - 2) PARROT, J.L. u. LAVOLLAY, J.: C.R.Séances Soc.Biol.Filiales 138, 82 (1944)
 - 3) SALVA, J.A., NEUMANN, J. u. LAVOLLAY, J.: C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 227, 1170 (1948)
 - 4) PARROT, J.L. u. LAVOLLAY, J.: C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 218, 211 (1944)
 - 5) PARROT, J.L., LAVOLLAY, J. u. GALMICHE, P.: C.R.Séances Soc. Biol.Filiales 138, 330 (1944)
 - 6) CRIMSON, J.M., BEREZ, R.R., MADDEN, J.D. u. FUHRMANN, F.A.: Amer.J.Physiol. 164, 391 (1951)
 - 7) REPKE, R.: Naturwissenschaften 46, 173 (1959)

Damit würde sich für viele Drogen mit hohem Flavongehalt ein neues Anwendungsgebiet eröffnen. Zusammen mit herzwirksamen Glykosiden wäre eine additive cardiotrope Wirkung, wie sie beispielsweise für Zubereitungen von Digitalis, Convallaria und Adonis beobachtet wurde, zu erwarten.

Um zu beurteilen, inwieweit die Verwendung der Schlehenblüten in der Volksmedizin bei Blähungskoliken, Magen- und Darmkrämpfen, bei Harnverhaltung und wegen der harn- und schweißstreibenden Wirkung als Blutreinigungsmittel⁸⁾ mit dem Gehalt an Flavonon begründet werden kann, oder ob darüberhinaus eine Anwendung zusammen mit einem Cardiacum gerechtfertigt erscheint, sollte die Droge auf ihren Flavongehalt untersucht werden. Um Aufschlüsse über eine diesbezügliche Verwendung der übrigen Rosaceen zu erhalten, untersuchten wir diese Familie chromatographisch auf ihre Flavonführung.

8) JARETZKY, R. u. GEITH, K.: "Die deutschen Heilpflanzen in Wort und Bild", Stuttgart, 1954

Allgemeiner Teil

A. BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN DER BLÜTEN VON PRUNUS SPINOSA L.

Erstmalig ist die Droge von A. G. PERKIN und S. PHIPPS⁹⁾ auf ihre Farbstoffe untersucht worden. Die beiden Forscher konnten durch Kochen mit Salzsäure und Ausschütteln mit Äther Kämpferol und Quercetin isolieren und identifizieren.

Bei der Untersuchung diuretisch wirkender Drogen auf Flavone hat sich auch R. COBET¹⁰⁾ mit dieser Pflanze befaßt. Durch Hydrolyse des Gesamtextraktes konnte er ebenfalls chromatographisch Kämpferol und Quercetin nachweisen. Außerdem gibt er die R_F -Werte von fünf Glykosiden an, die sich auf die obengenannten Aglykone zurückführen lassen. In einer Substanz mit dem R_F -Wert von 0,35 vermutete er Rutin.

B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON FLAVONEN IN DEN BLÜTEN VON PRUNUS SPINOSA L.

I. Isolierung der Flavone aus Flores Pruni spinosae (Flores Acaciae)

1) Herkunft und Sammeln der Droge

Für die Isolierung wurden 12,9 kg frisches Blütenmaterial an Ostern 1957 in der Umgebung von Langquaid gesammelt. Die Blüten ergaben 2,25 kg Trockendroge. Die im Handel befindliche Ware hatte sich wegen der starken Beimischungen von Blättern und Stengeln als ungeeignet erwiesen.

9) PERKIN, A.G. u. PHIPPS, S.: J.chem.Soc.(London) 85, 57 (1905)

10) COBET, R.: Dissertation, München 1957

2) Vorversuche

Nach dem Chromatographieren eines Probeextraktes waren keine exakten Aussagen über die einzelnen Flavone der Pflanze möglich, da eine Trennung derselben nicht erfolgte. Es traten aber neben den Flavonen mehrere im UV-Licht blau fluoreszierende Stoffe auf, die wir später noch untersuchten. Erst nach Reinigung und Isolierung der Flavoninhaltsstoffe konnten Glykoside und Aglykone bestimmten R_F -Werten zugeordnet werden. Beide Stoffgruppen haben wir mit fallenden R_F -Werten durchnummeriert.

3) Extraktion und Bereitung des wäßrigen Extraktes

Da sich die für die Isolierung von Flavonen meist verwendete Methanolextraktion wegen der mitextrahierten und später auf keine Weise zu entfernenden Ballaststoffe als unbrauchbar erwies, suchten wir nach einem neuen Verfahren. Wir fanden im 96%igen Äthanol ein geeignetes Extraktionsmittel.

Um den Extrakt endgültig zu reinigen, verdünnten wir mit Wasser auf das Zehnfache und stellten in den Kühlschrank, wobei sich eine große Menge amorpher, brauner Begleitstoffe abschied.

Um eine Hydrolyse der Flavone in der wäßrigen, sauren Lösung (p_H -Wert 3,8) zu unterbinden, stellten wir den Extrakt mit einer gesättigten, wäßrigen Natriumbikarbonatlösung auf einen p_H -Wert von 6,95 ein.

4) Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln

Es wurde versucht, aus der wäßrigen Lösung die Glykoside und Aglykone sukzessiv auszuschütteln. Dabei fanden Petroläther, Äther, Essigester und Methanol in wechselnden Zusammensetzungen Verwendung. Folgende Lösungsmittelgemische zeigten in der angegebenen Reihenfolge die besten Ergebnisse:

- a) Äther-Petroläther 1+1 (für Aglykone)
- b) Äther-20% Essigester (für Glykoside 1-4)
- c) Essigester-10% Methanol (für Glykoside 5-8).

Mit Gemisch a) konnten die Aglykone quantitativ entfernt werden.

Durch Gemisch b) gelang die Abtrennung der vier im R_F -Bereich zwischen 0,6 und 0,9 liegenden Flavonglykoside.

Das Lösungsmittel c) ermöglichte die Ausschüttelung der letzten vier Glykoside, die zwischen den R_F -Werten 0,6 und 0,3 liegen.

Setzten wir dem Äther statt 20% 30% Essigester zu, so wurden bereits alle Flavone bis zu einem R_F -Wert von 0,3 erfaßt.

5) Reinigung der Glykosidfraktionen

Die Äther - Petroläther - F r a k t i o n
reinigten wir durch Aufnehmen in Wasser und Abdampfen des Methanols auf dem Wasserbad. Aus der fast siedend heißen Lösung fielen während des Abkühlens die Aglykone aus, die noch heiß abfiltriert wurden.

Aus der Äther - E s s i g e s t e r - F r a k t i o n
konnten die Glykoside 2 und 3 nach Aufnehmen in Methanol und Zusatz von Wasser als Mischkristallisat erhalten werden; beim zurückgebliebenen Gemisch der Glykoside 1 bis 4 hat sich die Reinigung mittels kurzer Perlonsäulen bewährt. Das geeignetste Laufmittel hierzu ist Methanol-Wasser im Verhältnis 1:1.

Die E s s i g e s t e r - M e t h a n o l - F r a k t i o n
zeigte auf dem Chromatogramm zwischen den Flavonflecken drei blau fluoreszierende Stoffe. Die Chromatographie an Perlonsäulen bewirkte nur eine Verminderung dieser Begleitstoffe. Die auf dem Chromatogramm s i c h t b a r e n Begleitstoffe konnten dann durch Permutit C völlig entfernt werden. Wie sich nämlich bei der Hydrolyse der Glykoside 6 und 7 herausstellte, haftet diesen beiden Flavonen noch ein aus zwei Pentosen bestehender Begleitstoff an.

6) Trennung der gereinigten Fraktionen mit Hilfe von Perlonsäulen

Zur Trennung der Aglykone fand die Chromatographie an Perlon-säulen Verwendung. Das Gemisch wurde in drei Teilmengen aufgetragen und mit reinem Methanol nachgewaschen. Die ersten und letzten Fraktionen enthielten je ein reines Aglykon, die mittleren stellten Gemische dar.

Bei der Trennung der Essigester - Äther - F r a k t i o n stand uns als Ausgangsmaterial ein Mischkristallisat der Glykoside 2 und 3 und ein Gemisch der Glykoside 1 bis 4 zur Verfügung. Versuche mit Magnesol und Zellulose als Absorbens verliefen ohne Erfolg, weshalb wir zu Perlonsäulen übergingen.

Eine Trennung des aus Glykosid 2 und 3 bestehenden Kristallisates mit Perlon gelang glatt. Methanol diente dabei als Lösungsmittel.

Das Gemisch der Glykoside 1 bis 4 wurde in gleicher Weise entwickelt. Es gelang zunächst einen Teil der vorauslaufenden Säuren zu entfernen. Dieselbe 25 cm hohe Perlonsäule beschickten wir nochmals mit dem Gemisch; diesmal aber eluierten wir mit Methanol-Wasser (1+1). Damit erfolgte die Reinigung von allen Ballaststoffen. Eine Trennung der vier so vorgereinigten Glykoside erreichten wir allerdings erst durch Erhöhen der Säule auf 30 cm und durch Eluieren mit dem gleichen Methanol-Wasser-Gemisch. Wir erhielten die Glykoside 1, 2 und 3 chromatographisch rein. Es verblieb ein Gemisch der Flavone 2 und 4.

Diesen Rückstand befreiten wir durch zweimaliges Aufnehmen in Methanol vom Perlon, engten ein, verdünnten mit Wasser und stellten einige Tage bei Zimmertemperatur beiseite. Nach vier Tagen war Glykosid 4 in schönen Nadeln ausgefallen, so daß es abgenutscht werden konnte. In Lösung blieb Glykosid 2. Die Trennung der beiden Glykoside war quantitativ.

Auch zur Trennung der Essigester - M e t h a n o l - F r a k t i o n machten wir zunächst Vorversuche mit Magnesol- und Zellulosesäulen, die negativ verliefen, während Perlonsäulen zum Erfolg führten.

Wir eluierten mit Methanol-Wasser (1+2). Mit diesem System konnte Glykosid 5 isoliert werden, wogegen die Trennung der übrigen Flavone damit nicht gelang.

Durch fünfmaliges Aufnehmen in kaltem Methanol reinigten wir Glykosid 5 vom anhaftenden Perlen. Die Kristallisation erfolgte aus Methanol. Wir erhielten 133 mg des Glykosides.

Da die Säulenversuche keine Trennung der Glykoside 6 und 7 ergeben hatten, versuchten wir es auf papierchromatographischem Wege. Wir ließen den Extrakt 36 Stunden in Butanol-Eisessig-Wasser, 4+1+5 (BEW) als Durchlaufchromatogramm laufen. Da sich aber keine deutliche Auftrennung ergab, wurden drei Zonen ausgeschnitten, die wir mit Methanol eluierten. Die Zonen wurden von der Front zur Startlinie mit römischen Ziffern benannt.

Beim Chromatographieren der eluierten Zonen in dem Lösungsmittelgemisch Isopropanol-Ameisensäure-Wasser, 1+2+2 (IAW) trat bei den Stoffen der Streifen II und III neben Glykosid 7 ein weiterer Fleck in Erscheinung. Er zeigte im UV-Licht unbesprüht die Flavonfarbe; beim Besprühen mit basischem Bleiazetat und Aluminiumsulfatlösung wurde er mißfarben. Wir wollen diesen Stoff als Glykosid 8 bezeichnen.

Zur Abtrennung dieser Substanz setzten wir nochmals kleine Säulen mit Wasser an. Dazu wurde nicht mehr Perlon der Firma Bayer sondern Perlon der BASF (Ultramid K 228 BM 2) verwendet. Auf diese Weise war es möglich, Glykosid 8 als Vorlauf zu erhalten.

Die aus Zone I eluierten Stoffe gaben wir über eine kurze Perlonsäule mit Wasser, wobei Glykosid 6 chromatographisch rein gewonnen wurde.

Nach einer gleichartigen Säulenpassage konnten wir auch Glykosid 7 aus den Zonen II und III chromatographisch rein isolieren.

II. Identifizierung der gefundenen Flavone

1) Identifizierung der aus der Droge isolierten Aglykone

a) Identifizierung von Aglykon 1 als Kämpferol

Dreimaliges Umkristallisieren der Substanz ergab einen Schmelzpunkt von $270-271^{\circ}$ C. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Kämpferol zeigte keine Depression.

Alle Farbreaktionen und papierchromatographischen Vorversuche in verschiedenen Lösungsmitteln hatten ebenfalls die Übereinstimmung mit Kämpferol bewiesen.

Von 328 mg Substanz verwendeten wir 14 mg zur Darstellung des Azetates, das nach zweimaligem Umkristallisieren den in der Literatur für Kämpferolazetat angegebenen Schmelzpunkt von $178-181^{\circ}$ C hatte. Der Mischschmelzpunkt mit dem synthetisch hergestellten Produkt zeigte keine Depression.

Die Maxima der UV-spektrophotometrischen Untersuchungen lagen bei 267 m μ und 365 m μ .

Die Elementaranalyse hat folgende Werte ergeben:

Molekulargewicht der Summenformel $C_{15}H_{10}O_6 = 286,23$.

Ber. C: 62,93% gef. C: 60,23%

Ber. H: 3,52% gef. H: 4,43%.

Bei Aglykon 1 handelt es sich demnach um K ä m p f e r o l .

b) Identifizierung von Aglykon 2 als Quercetin

Von dieser Substanz wurden insgesamt 125 mg mit einem Schmelzpunkt von $299-301^{\circ}$ C isoliert.

Chromatographische Vorversuche und Farbreaktionen wiesen auf Quercetin hin.

Der Schmelzpunkt stimmte mit dem in der Literatur für Quercetin angegebenen von $300-302^{\circ}$ C überein; der Mischschmelzpunkt ergab keine Depression.

Der Schmelzpunkt des Azetylproduktes lag zwischen 188 und 190° C. Beim Mischschmelzpunkt mit authentischem Quercetin-pentaacetat war keine Depression zu erkennen.

Die UV-Maxima der Substanz lagen übereinstimmend mit denen von Quercetin bei 255 mμ und 370 mμ.

Die Elementaranalyse hat folgende Werte ergeben:
Molekulargewicht der Summenformel $C_{15}H_{10}O_7 = 302,23$.

Ber. C: 59,60%	gef. C: 60,23%
Ber. H: 3,34%	gef. H: 4,31%

Somit ist das zweite Aglykon als Q u e r c e t i n identifiziert worden.

Damit ist bewiesen, daß in der Droge die Aglykone Kämpferol und Quercetin frei enthalten sind. Das Untersuchungsergebnis von A. G. PERKIN und S. PHIPPS¹¹⁾ ist damit bestätigt. Diese hatten den Extrakt mit Salzsäure behandelt und anschließend ausgeschüttelt, so daß eine Aussage darüber, ob die Aglykone primär vorliegen oder ob sie erst sekundär aus den Glykosiden gebildet werden, nicht möglich war. Auch bei unseren Untersuchungen ist die Möglichkeit nicht ganz auszuschließen, daß durch den sauren Charakter des wäßrigen Extraktes eine geringfügige Hydrolyse eingetreten war.

2) Identifizierung der Glykoside

a) Identifizierung von Glykosid 1 als Kämpferol-3-rhamnosid

Dieses Glykosid war in der Droge nur in geringer Menge enthalten, so daß die Identifizierung wegen Substanzmangel aus der Lösung vorgenommen wurde.

Vergleichende Chromatogramme hatten nach dem Besprühen mit Aluminiumchloridlösung und basischem Bleiazetat gezeigt, daß es sich um ein Kämpferol-3-monosid handelt. Auf dem Chromatogramm zeigte der Flavonfleck, wie alle am C-3-Atom verglykosidierten Flavonglykoside, unbesprüht im UV-Licht dunkle Färbung.

Durch den Zirkon-Zitronensäure-Test wurde das C-3-Atom als Verglykosidierungsstelle festgelegt.

11) PERKIN, A.G. u. PHIPPS, S.: J.chem.Soc.(London) 85, 57 (1905)

Nach der Hydrolyse des Glykosides ergab der chromatographische Vergleich in IAW mit authentischen Testsubstanzen eindeutig K ä m p f e r o l mit einem R_f -Wert von 0,26 als Aglykonanteil.

Der Zucker ist durch Chromatographie in Pyridin-Äthylazetat-Wasser, 1+2+2 (PÄW) bestimmt worden. Durch den R_f -Wert von 0,6 und durch Testsubstanzen konnte R h a m n o s e als Zuckeranteil ermittelt werden.

Die Maxima der UV-spektrophotometrischen Messungen des Glykosides von 265 m μ und 345 m μ stimmten mit denen von Kämpferol-3-rhamnosid überein.

Glykosid 1 ist somit als K ä m p f e r o l - 3 - r h a m n o s i d charakterisiert.

Dieses Glykosid isolierten erstmals F. E. KING und R. M. ACHESON¹²⁾ aus dem Holz von Bäumen der Gattung Afzelia. Die Autoren gaben der Verbindung den Namen A f z e l i n .

b) Identifizierung von Glykosid 2 als Kämpferol-3-arabinsid

Nach fünfmaligem Umkristallisieren erhielten wir 80 mg Substanz mit einem Schmelzpunkt von 228-230° C.

Bei der Reduktion der Substanz mit Zink bzw. mit Magnesium und HCl trat eine rosa Färbung der Lösung auf. Dies läßt auf Flavone bzw. auf Flavonol-3-glykoside schließen.

Zum papierchromatographischen Vergleich wurde Kämpferol-3-arabinsid als Testsubstanz herangezogen.

Die Maxima des UV-Spektrums hatten folgende Werte:
 $E_{spez. 265\text{ m}\mu} = 42,0$ und $E_{spez. 348\text{ m}\mu} = 33,7$.

Durch den Zirkon-Zitronensäure-Test bewiesen wir, daß die Verglykosidierung am C-3-Atom erfolgt.

Die quantitative Hydrolyse ergab 70% Aglykon, so daß es sich um ein Monosid handeln mußte.

12) KING, F.E. u. ACHESON, R.M.: J.chem.Soc.(London) 168 (1950)

Den Zuckeranteil mit einem R_f -Wert von 0,49 konnten wir der Arabinose zuordnen. Auch der Schmelzpunkt des Osazons von 158-160° C stimmte mit dem des Arabinoseosazons überein. Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression.

Durch zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol-Wasser gelangten wir zu schmelzpunkt reinem Aglykon. Es zeigte schon auf dem Chromatogramm Übereinstimmung mit Kämpferol. Bezeichnend hierfür war das UV-Spektrum, dessen Maxima 267 m μ und 365 m μ betrugten, und der Schmelzpunkt von 270-271° C. Das Azetat schmolz wie Kämpferolazetat bei 178-181° C und auch dessen Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression.

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

Molekulargewicht der Summenformel $C_{20}H_{18}O_{10}$ = 418,33.

Ber. C : 57,42

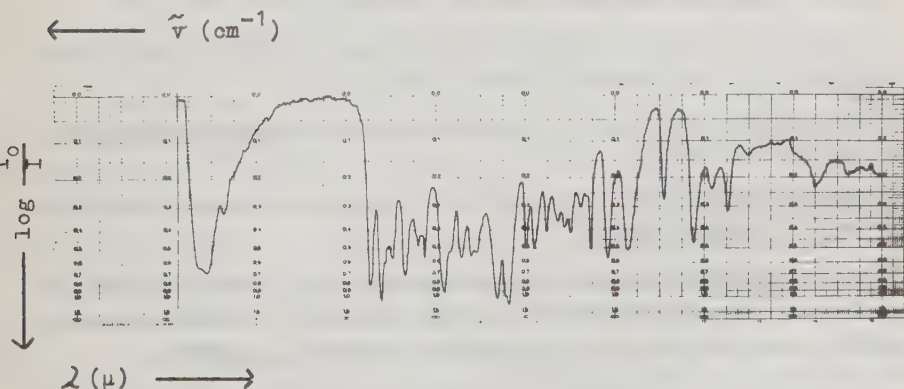
gef. C : 54,52

Ber. H : 4,43

gef. H : 4,72.

Zur Identifizierung von Glykosid 2 ist außerdem das IR-Spektrum angefertigt worden. Dieses ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine eingehende Diskussion des Spektrums befindet sich im IR-Teil dieser Arbeit auf Seite 28 bis 32.

Abb. 1



IR-Spektrum des Kämpferol-3-arabinosids
Konzentration: 1172 γ /300 mg KBr

Hiermit ist Glykosid 2 eindeutig als K ä m p f e r o l - 3 - a r a b i n o s i d identifiziert.

Diese Verbindung wurde erstmals von unserem Arbeitskreis, H. J. GEHRMANN, L. ENDRES, R. COBET und U. FIEDLER¹³⁾, in den Blüten der Roßkastanie gefunden.

c) Identifizierung von Glykosid 3 als Quercetin-3-arabinosid

Dieses Flavon war schon früher in größerer Menge isoliert worden. Es hydrolysierte aber als wir versuchten, es von den anhaftenden Verunreinigungen zu befreien. Aus diesem Grunde isolierten wir es in geringer Menge aus den Mutterlaugen der Ätherfraktion nach.

Vergleichende papierechromatographische Untersuchungen wiesen auf ein Quercetinmonosid hin.

Nach der Hydrolyse fanden wir für das Aglykon in IAW einen R_F -Wert von 0,19, der mit dem von Q u e r c e t i n übereinstimmt. Der Schmelzpunkt des Azetates von 188-190° C war mit dem von authentischem Quercetinazetat identisch; der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression.

Die mit Barytwasser neutralisierte Hydrolyseflüssigkeit chromatographierten wir in PÄW. Es zeigte sich der für A r a b i n o s e charakteristische Fleck mit einem R_F -Wert von 0,49.

Durch den Zirkon-Zitronensäure-Test legten wir die Verglykosidierungsstelle am Kohlenstoffatom 3 fest.

Die Maxima der UV-spektrophotometrischen Messungen lagen bei 255 m μ und bei 355 m μ .

Damit ist Glykosid 3 als Q u e r c e t i n - 3 - a r a b i n o s i d identifiziert.

Quercetin-3-arabinosid wird auch als A v i c u l a r i n bezeichnet. Dieser Name wurde ihm von T. OHTA¹⁴⁾ gegeben, der es erstmals aus dem Kraut von Polygonum aviculare L. gewann.

13) GEHRMANN, H.J., ENDRES, L., COBET, R. u. FIEDLER, U.: Naturwissenschaften 42, 181 (1955)

14) OHTA, T.: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 263, 221 (1940)

Außerdem wurde das Flavon von C. H. ICE und S. H. WENDER¹⁵⁾ aus den Blättern von *Vaccinium myrtillus* L. isoliert.

W. ENDRES¹⁶⁾ isolierte das Glykosid aus den Blättern von *Filipendula ulmaria* L. und hat es in vielen anderen *Spiraea*-Arten nachgewiesen.

d) Identifizierung von Glykosid 4 als Kämpferol-7-rhamnosid

Durch Umkristallisieren aus Methanol-Wasser gewannen wir 75 mg dieses Glykosides kristallin als gelbliche Nadeln. Der Schmelzpunkt lag zwischen 230 und 232° C.

Die Beobachtung unter der UV-Lampe hatte gezeigt, daß das Glykosid unbesprüht grüngelb war. Durch den Zirkon-Zitronensäure-Test stellten wir fest, daß das Kohlenstoffatom 3 des Flavons nicht besetzt ist.

Die Gesamthydrolyse mit 10 ml 2,5%iger HCl ergab 63,8% Aglykon, was für ein Monosid spricht.

Mit Hilfe der Papierchromatographie, der Schmelz- und Mischschmelzpunkte des Aglykons von 270-271° C sowie der gleichen Daten des Azetates von 178-181° C ist als Aglykonanteil K ä m p f e r o l eindeutig identifiziert.

Als Zuckerkomponente ermittelten wir R h a m n o s e . Auf dem Chromatogramm in PÄW trat nur ein Punkt auf, der mit der als Testsubstanz mitlaufenden Rhamnose völlig übereinstimmte. Beide hatten einen R_f -Wert von 0,6. Durch das Osazon mit dem Schmelzpunkt von 179-182° C und dessen Mischschmelzpunkt ist die Rhamnose als Zuckeranteil des Glykosides eindeutig identifiziert.

Offen bleibt noch die Frage der Zuckerstellung. Nachdem Kohlenstoffatom 3 nicht besetzt ist, verbleiben beim Kämpferol nur noch die C-7-, die C-4'- und die C-5-Stellung.

Da der Schmelz- und Mischschmelzpunkt von 230-232° C mit dem

15) ICE, C. H. u. WENDER, S. H.: J.Amer.chem.Soc. 75, 50 (1953)

16) ENDRES, W.: Dissertation, München 1955

von F. RICHTHAMMER¹⁷⁾ isolierten Glykosid A (Kämpferol-4'-arabinsosid) übereinstimmt und sich auch sonst keine Unterschiede zwischen den beiden Glykosiden ergaben, nahmen wir vergleichende Untersuchungen auf. Dabei konnten wir zeigen, daß das von F. RICHTHAMMER beschriebene Glykosid A ebenfalls als Zucker nur R h a m n o s e trägt.

Zur Klärung der Zuckerstellung besprühten wir die beiden Flavone mit Echtblausalzlösung "Bayer". Dabei zeigte sich keine Reaktion, was für ein am Kohlenstoffatom 7 substituiertes Flavon spricht.

Die Absorptionsspektren der beiden Glykoside ergaben übereinstimmende Werte. Die Maxima waren: $E_{\text{spez.}}$ 265 m μ = 50,77 und $E_{\text{spez.}}$ 365 m μ = 59,62.

Messungen im Zeiß-Spektralphotometer im Natriumazetatmilieu zeigten eine Verschiebung des zweiten Maximums um nur 15 m μ von 365 m μ auf 380 m μ , was die Verglykosidierung am Kohlenstoffatom 7 bestätigt. Vergleichende Messungen mit Kämpferol-7-rhamnosid aus Robinin, aus Kämpferol-3,7-dirhamnosid von L. STICH¹⁸⁾ und aus Kämpferol-3,7-dirhamnosid der eigenen Isolierungsarbeit ergaben übereinstimmend eine Verschiebung um 15 m μ .

Die Elementaranalyse erbrachte folgende Werte:

Der Bruttoformel $C_{21}H_{20}O_{10}$ entspricht ein Molekulargewicht von 430,37.

Ber. C : 58,19% gef. C : 56,93%

Ber. H : 4,68% gef. H : 4,99%.

Außerdem wurde das IR-Spektrum des Glykosides angefertigt (siehe Abb. 2, S. 15). Zum Vergleich zeigt Abbildung 3 (S. 15) das IR-Spektrum von Glykosid A aus den Blättern von *Prunus spinosa* L. Die beiden Spektren beweisen unter anderem die Identität der zwei Verbindungen. Eine eingehende Diskussion der Spektren befindet sich im IR-Teil auf Seite 28 bis 32.

17) RICHTHAMMER, F.: Dissertation, München 1956

18) STICH, L.: Dissertation, München 1958

Abb. 2

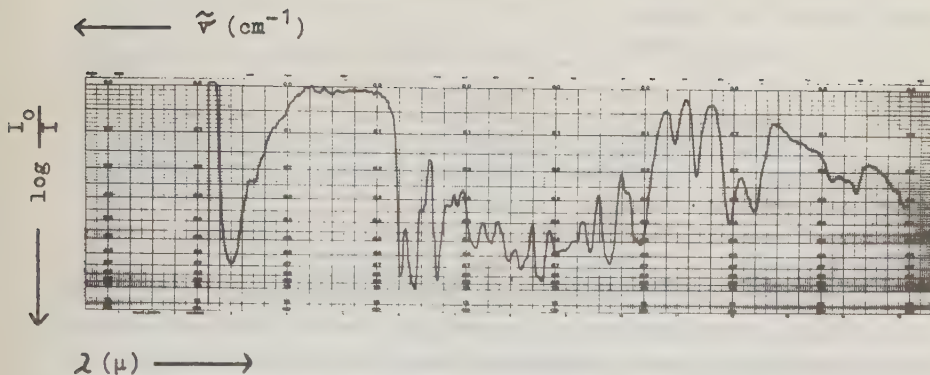
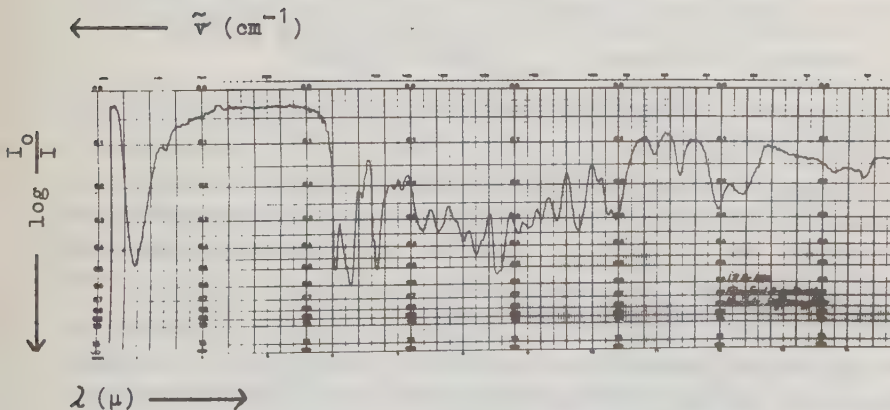


Abb. 3



Damit ist Glykosid 4 als K ä m p f e r o l - 7 - r h a m -
n o s i d identifiziert.

Für dieses Glykosid sind in der Literatur¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾ bisher keine Angaben zu finden.

F. RICHTHAMMER²²⁾ hatte diesen Stoff erstmals in Händen. Er identifizierte ihn aber als Kämpferol-4'-arabinosid.

Außerdem ist Kämpferol-7-rhamnosid jeweils bei der partiellen Hydrolyse mit Cyclohexanol und Ameisensäure²³⁾ von Kämpferol-3,7-dirhamnosid und Robinin aufgetreten.

e) Identifizierung von Glykosid 5 als Kämpferol-3,7-dirhamnosid

Dieses Glykosid ist als das Hauptglykosid der Droge aufzufassen. Durch Umkristallisieren aus Methanol-Wasser gelangten wir zu einer Gesamtmenge von 133 mg in Form feiner, gelblicher Nadeln.

Der Schmelzpunkt wurde mit 186-187° C ermittelt. Der Mischschmelzpunkt mit dem von L. STICH²⁴⁾ isolierten Produkt ergab keine Depression. Auch R_f -Werte, Farbreaktionen und UV-Spektren stimmten mit den von L. STICH angegebenen Werten überein.

Das Absorptionsspektrum hatte die typischen Banden bei $E_{\text{spez.}} 265 \text{ m}\mu = 39,52$ und $E_{\text{spez.}} 343 \text{ m}\mu = 28,50$.

Die quantitative Hydrolyse ergab 43,2% Aglykon, was auf ein Diglykosid hinweist.

Als Aglykonanteil ermittelten wir K ä m p f e r o l . Dieses identifizierten wir durch Papierchromatographie und seinen Schmelzpunkt von 270-271° C. Außerdem wurde das Azetat dargestellt, dessen Schmelz- und Mischschmelzpunkt von 178-181° C mit synthetischem Kämpferolazetat übereinstimmte.

Als Zucker identifizierten wir R h a m n o s e . Deren Nachweis als Osazon mit dem Schmelzpunkt 179-182° C gelang eindeutig.

19) KLEIN, G.: "Handbuch der Pflanzenanalyse, Wien 1932, Bd. III, S. 865-881

20) PAECH, K. u. TRACEY, M.V.: "Methoden der Pflanzenanalyse", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Bd. III, S. 450-495

21) KARRER, W.: "Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe", Basel-Stuttgart 1958

22) RICHTHAMMER, F.: Dissertation, München 1956

23) FOX, D.W., SAVAGE, W.L. u. WENDER, S.H.: J.Amer.chem.Soc. 75, 2504 (1953)

24) STICH, L.: Dissertation, München 1958

Es handelt sich also um ein Diglykosid mit Kämpferol als Aglykon und Rhamnose als Zuckeranteil.

Die Frage der Zuckerstellung ist noch offen. Als erste Verknüpfungsstelle fanden wir mittels Zirkon-Zitronensäure-Test und den Farben im UV-Licht das C-3-Atom.

Zur Ermittlung der zweiten Verglykosidierungsstelle führten wir die partielle Hydrolyse nach D. W. FOX, W. L. SAVAGE und S. H. WENDER²⁵⁾ durch. Als Hydrolyseprodukte fanden wir Kämpferol, Kämpferoldirhamnosid, Kämpferol-3-rhamnosid und Kämpferol-7-rhamnosid. Die Isolierung der beiden letzteren Stoffe erfolgte durch Streifenchromatogramme in IAW. Die Monoside verglichen wir auch in den Lösungsmitteln ÄAW und BEW mit authentischen Testsubstanzen, wodurch das vorherige Ergebnis bestätigt wurde. Die Hydrolyse der Monoglykoside ergab als Spaltprodukte jeweils Kämpferol und Rhamnose. Bei der Untersuchung im Zeiß-Spektralphotometer zeigten die Kurven und Maxima mit denen der Vergleichssubstanzen (siehe Tab. 9, S. 61) völlige Übereinstimmung.

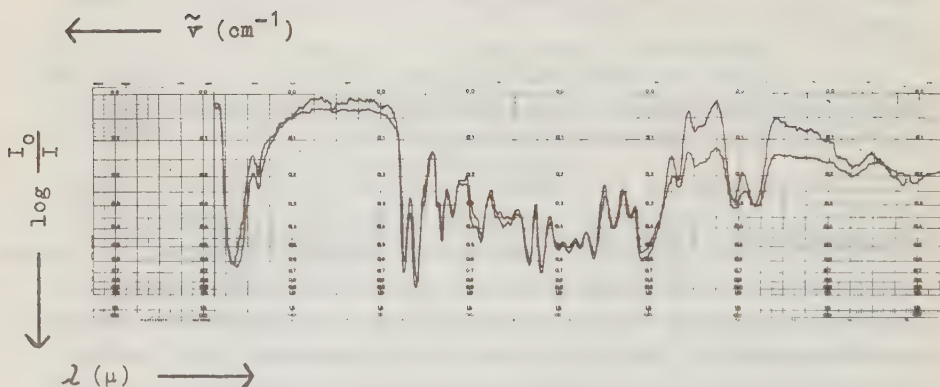
Das Spaltprodukt der partiellen Hydrolyse, Kämpferol-7-rhamnosid, reinigten wir durch eine kleine Perlonsäule. Die Maxima und die Werte der Verschiebung im Natriumazetatmilieu stimmten mit den bei Glykosid A gemessenen überein. So entspricht dieses Monosid einem Kämpferol-7-rhamnosid, während das zweite ein Kämpferol-3-rhamnosid darstellt.

Weiterhin zogen wir zur Identifizierung das IR-Spektrum heran. Nachstehende Abbildung 4 (S. 18) zeigt die Überlagerungsaufnahme von Glykosid 5 verglichen mit Kämpferol-3,7-dirhamnosid, das von L. STICH²⁶⁾ aus Flores Tiliae DAB 6 isoliert wurde. Die eingehende Diskussion des Spektrums erfolgt im IR-Teil auf Seite 28 bis 32.

25) FOX, D.W., SAVAGE, W.L. u. WENDER, S.H.: J.Amer.chem.Soc. 75, 2504 (1953)

26) STICH, L.; Dissertation, München 1958

Abb. 4



Überlagerungsaufnahme der IR-Spektren von Kämpferol-3,7-dirhamnosid aus Flores Tiliae DAB 6 (stärkere, tiefere Bande) und Glykosid 5 (höhere, dünnere Bande). Konzentration von Glykosid 5: 1212 γ /300 mg KBr; Konzentration von Kämpferol-3,7-dirhamnosid aus Flores Tiliae DAB 6 : 920 γ /300 mg KBr.

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

Molekulargewicht der Summenformel $C_{27}H_{30}O_{14} = 578,51$.

Ber. C : 56,05%

gef. C : 54,84%

Ber. H : 5,23%

gef. H : 5,75%.

Mit diesen Ergebnissen ist Glykosid 5 eindeutig als K ä m p f e r o l - 3 , 7 - d i r h a m n o s i d identifiziert.

Das von uns isolierte Glykosid wurde erstmals von A. G. PERKIN²⁷⁾ aus den Blättern von Indigofera arreta gewonnen. Dieser Forscher gab der Verbindung den Namen K ä m p f e r i t r i n .

S. HATTORI und M. HASEGAWA²⁸⁾ isolierten aus den Blättern von Lespeda cyrtobotrya eine Flavonverbindung, die sie L e s - p e d i n benannten. Die gleichen Autoren²⁹⁾ erkannten später,

27) PERKIN, A.G.: ref. C.A. 1433 (1906)

28) HATTORI, S. u. HASEGAWA, M.: ref. C.A. 34, 3740 (1940)

29) HATTORI, S. u. HASEGAWA, M.: ref. C.A. 46, 2541 (1952)

daß Kämpferitrin und Lespedin miteinander identisch sind.

Außerdem hat L. STICH³⁰⁾ Kämpferol-3,7-dirhamnosid aus Flores Tiliae DAB 6 isoliert.

f) Untersuchungsergebnisse zum Nachweis von Glykosid 6 als Kämpferol-3-rhamnoglukosid

Von diesem Glykosid bekamen wir 68 mg eines amorphen Produktes mit dem Schmelzpunkt zwischen 170 und 173° C. Eine völlige Reinigung des Flavons gelang nicht.

Durch Lösen des Glykosides in Methanol und sofortigem Zusatz der fünffachen Menge Essigester gelang es, erhebliche Verunreinigungen zu entfernen. Aber auch durch eine Bleifällung erhielten wir kein völlig reines Produkt.

Bei der Hydrolyse der Glykoside 6 und 7 sind die Zucker Arabinose und Xylose zusätzlich auf den Chromatogrammen aufgetreten. Auch bei der Nachisolierung des Hauptglykosides von Folia Pruni spinosae war es möglich, in der Mutterlauge die beiden Zucker zusätzlich zur Rhamnose nachzuweisen. Da die im Pflanzenreich auftretenden Schleime meist aus Pentosen bestehen, ist es naheliegend, daß sich in den Blättern und Blüten von Prunus spinosa L. ein Pflanzenschleim befindet, der bei Hydrolyse Arabinose und Xylose ergibt.

Die Auswertung der papierchromatographischen Vorversuche hatte eine Zuordnung zu Kämpferol-3-rhamnoglukosid ermöglicht.

Die quantitative Hydrolyse ergab einen Anteil von 38% Aglykon. Es muß sich also um ein Diglykosid handeln.

Der Schmelzpunkt des Aglykons lag zwischen 270 und 271° C. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Kämpferolazetat war gleich hoch. Wir stellten das Azetat her. Durch seinen Schmelzpunkt von 178-181° C und seinen Mischschmelzpunkt konnten wir als Aglykon K ä m p f e r o l identifizieren.

Zur Bestimmung der Zucker verwendeten wir verschiedene Hydrolyse- und Neutralisationsmethoden. So wurde mit Salzsäure und Schwe-

30) STICH, L.: Dissertation, München 1958

felsäure in wechselnden Konzentrationen gearbeitet. Zum Neutralisieren verwendeten wir Dowex, Silberoxyd und Barytwasser, fanden aber als Zucker immer Rhamnose, Glukose, Arabinose und Xylose. Aus den oben genannten Gründen dürften die Pentosen Arabinose und Xylose durch Hydrolyse eines Pflanzenschleimes entstehen.

Wie sich aus dem Zirkon-Zitronensäure-Test ergab, mußte die Verglykosidierung am C-3-Hydroxyl stattgefunden haben.

Die Maxima mit den Werten 255 m μ und 350 m μ der UV-spektrophotometrischen Messung stimmten mit authentischem Material überein.

Es handelt sich also um K ä m p f e r o l - 3 - r h a m n o - g l u k o s i d .

g) Untersuchungsergebnisse zur Identifizierung von Glykosid 7 als Quercetin-3-glukorhamnosid = Rutin

Die Ausbeute betrug 84 mg chromatographisch reiner Substanz. Wie Glykosid 6 war sie aber mit dem bei der Hydrolyse Arabinose und Xylose liefernden Stoff behaftet.

Infolge dieser Verunreinigungen erreichte der Schmelzpunkt nur 174-178° C.

Chromatographische Untersuchungen hatten auf Rutin hingewiesen. Durch die Bleifärbung im UV-Licht ist Quercetin als Aglykon wahrscheinlich gemacht worden.

Die quantitative Hydrolyse ergab 40% Aglykon, was auf ein Diglykosid hinweist.

Das Aglykon mit einem R_f -Wert von 0,24 in IAW stimmte mit Quercetin überein. Es hatte einen Schmelzpunkt von 299-300° C. Der Schmelzpunkt des Azetates und dessen Mischschmelzpunkt mit authentischem Quercetinazetat lag bei 188-190° C. Damit ist als A g l y k o n a n t e i l eindeutig Q u e r c e t i n identifiziert.

Das Zuckerchromatogramm zeigte Rhamnose, Glukose, Arabinose und Xylose mit den in PEW zugehörigen R_f -Werten 0,60, 0,53, 0,49 und 0,46. Die beiden letzten Zucker sind wieder als Hydrolyseprodukte eines Schleims zu werten.

Bei der UV-spektrophotometrischen Untersuchung fanden wir übereinstimmend mit Rutin die Maxima bei 255 m μ und 358 m μ .

Wir konnten als Aglykon eindeutig Quercetin identifizieren. Bei dem Glykosid dürfte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Rutin handeln.

h) Versuche zur Identifizierung von Glykosid 8

Dieses Glykosid wies in fast allen Lösungsmitteln gleiche Laufhöhe mit Rutin auf. Allein in IAW ergab sich eine Differenzierung. Hier unterschied es sich mit einem R_F -Wert von 0,83 deutlich von dem in der Droge enthaltenen Rutin (R_F -Wert in IAW 0,67).

Aufgefallen war besonders die Färbung dieses Glykosides nach Besprühen mit Aluminiumsulfatlösung oder mit basischem Bleiazetat. Unbesprüht zeigte es unter der UV-Lampe einen dunklen Fleck, der sich nach dem Besprühen nicht gelb oder orange färbte sondern dunkel blieb.

Die R_F -Werte stimmten mit den von L. STICH³¹⁾ für Glykosid 1 angegebenen Daten überein. Es sind dies: für AAW, R_F -Wert 0.35, für BEW, R_F -Wert 0.34 und für IAW R_F -Wert 0,83.

Auch die drei Maxima des UV-Spektrums mit 272,5 m μ , 325 m μ und 350 m μ sind mit den von L. STICH angegebenen Werten identisch.

Der gleiche Autor fand chromatographisch in PÄW Glukose und eine weitere Substanz, die den R_F -Wert eines Disaccharides hatte, als Zuckerkomponenten dieser Substanz.

Das Grundgerüst hat er als Flavon erkannt, von dessen fünf OH-Gruppen drei erwiesenermaßen am C-3, C-5 und C-4' sitzen. Die restlichen zwei OH-Gruppen können nun in C-6, C-7, in C-6, C-8 bzw. in C-7, C-8 Stellung sitzen. Da die C-3-OH und die C-5-OH-Gruppe frei ist, muß eine der drei restlichen OH-Gruppen methyliert sein.

Eingehendere Untersuchungen konnten wegen Substanzmangel nicht durchgeführt werden.

31) STICH, L.: Dissertation, München 1958

C. NACHISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DES HAUPTGLYKOSIDES AUS
DEN BLÄTTERN VON PRUNUS SPINOSA L.

I. Bisherige Bearbeitung

1) Ergebnisse der Arbeit von F. RICHTHAMMER³²⁾

F. Richthammer hat das Hauptglykosid aus den Blättern von *Prunus spinosa* L. (B) als K ä m p f e r o l - 3 - r h a m n o - s i d o - 4' - a r a b i n o s i d charakterisiert. Die Zucker hat er chromatographisch und mit Hilfe ihrer Osazone nachgewiesen. Nach der quantitativen Hydrolyse fällte er die Zucker als Phenyl-osazongemisch und trennte sie auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit in heißem Wasser.

Zur Bestätigung seiner Hypothese führte er verschiedene Spaltungen durch.

Mittels eines Tannase-Hydrolasengemisches, das er auf Glykosid B einwirken ließ, hat F. Richthammer eindeutig Kämpferol-3-rhamnosid erhalten.

Durch Behandeln mit 4%iger Ameisensäure ist der Zucker am C-3-Atom abgespalten worden. Als Spaltprodukt resultiert hieraus Glykosid Ch., das er als Kämpferol-4'-arabinosid beschreibt. F. Richthammer schreibt über die Hydrolyse dieser Verbindung in seiner Arbeit: "Auf dem Papierchromatogramm zeigten sich neben Arabinoseflecken auch Zuckerpunkte, die auf gleicher Höhe mit Rhamnose lagen".

Das aus *Folia Pruni spinosae* isolierte Glykosid A ist identisch mit Glykosid Ch. Es wurde ebenfalls als Kämpferol-4'-arabinosid identifiziert. F. Richthammer erwähnt bei der Hydrolyse dieses Stoffes, daß der Zuckeranteil auch hier nicht immer nur als Arabinose in Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei Glykosid Ch. angesehen werden konnte.

³²⁾ RICHTHAMMER, F.: Dissertation, München 1956

Die Zuckerstellung des Glykosides B bestimmte F. RICHTHAMMER³³⁾ durch Methylieren. Die Methoxygruppenbestimmung zeigte einen Dimethyläther an. Außer am C-3 mußte also noch eine weitere Verglykosidierungsstelle vorliegen. Als Schmelzpunkt seines Dimethyläthers fand F. Richthammer 276-278° C.

G. ZEMPLEN und R. BOGNAR³⁴⁾ haben beim Kämpferol-3,7-robinosid für das Methylprodukt einen Schmelzpunkt von 316-318° C angegeben. Von dieser Tatsache ausgehend hat F. Richthammer die 3,7-Zuckerstellung seines Glykosides ausgeschlossen. Zu dieser Zeit erschien eine Arbeit von J. M. GUIDER, T. H. SIMPSON und D. H. THOMAS³⁵⁾, die unter anderem Kämpferol-dimethyläther beschreiben. Diese Autoren geben für den 7,4'-Äther einen Schmelzpunkt von 180-182° C und für den 5,7-Äther einen solchen von 278-280° C an. Wegen der nominellen Übereinstimmung des letzten Wertes mit dem eigenen Methylprodukt nahm F. Richthammer die 3,4'-Stellung seines Kämpferolglykosides an. Eine authentische Vergleichsprobe des Äthers stand nicht zur Verfügung.

Nach einer Arbeit von R. J. ROY³⁶⁾ schmilzt der Dimethyläther des Lespedins (Kämpferol-3,7-dirhamnosid) bei 278° C. L. STICH³⁷⁾ fand für diese Substanz nach der Sublimation einen Wert von über 295° C.

Das Methylprodukt F. Richthammers ist also dem 5,4'-Dimethyläther zuzuordnen. Durch Sublimation wäre es wahrscheinlich noch möglich gewesen, den Schmelzpunkt zu erhöhen.

Diese Widersprüche veranlassten uns, das Hauptglykosid und dessen Spaltprodukte, die noch von F. Richthammer stammten, nachzuarbeiten.

33) RICHTHAMMER, F.: Dissertation, München 1956

34) ZEMPLEN, G. u. BOGNAR, R.: Chem. Ber. 74, 1784 (1941)

35) GUIDER, J.M., SIMPSON, T.H. u. THOMAS, D.B.: J.chem.Soc.(London) 170 (1955); ref. C.A. 49, 13986 (1955)

36) ROY, R.J.: "The Plant Glycosides", London 1950, S. 37-44

37) STICH, L.: Dissertation, München 1958

2) Ergebnisse der Hydrolysen des von F. Richthammer isolierten Hauptglykosides und seiner Spaltprodukte

Als erstes unterwarfen wir das Produkt der Tannasespaltung (Kämpferol-3-rhamnosid) der Hydrolyse, wobei erwartungsgemäß Rhamnose als Zucker auftrat.

F. Richthammers Produkt der chemischen Spaltung (Kämpferol-4'-arabinosid !) und Glykosid A erhitzten wir 1 Stunde lang am Rückflußkühler. Als Zucker war jeweils nur Rhamnose zu erkennen. Um unter allen Umständen eine quantitative Hydrolyse zu erzielen, setzten wir einen weiteren Versuch mit 10 ml 10%iger HCl an, den wir 3 Stunden laufen ließen. Das Resultat war wieder nur R h a m - n o s e .

Als letztes untersuchten wir das Hauptglykosid. Wir hydrolysierten 1 Stunde lang mit 5%iger HCl und neutralisierten mittels Dowex. Als Zucker erschienen auf dem Chromatogramm deutlich Rhamnose, schwach Arabinose und ganz wenig Xylose.

Diese Untersuchungen bestätigten zwar die Widersprüche, gaben aber keinen Hinweis zur Lösung. Da die Substanz aufgebraucht war, galt es zunächst zum Zwecke der weiteren Bearbeitung eine genügende Menge des Flavones nachzuisolieren.

II. Vereinfachte Isolierung des Hauptglykosides aus den Blättern von *Prunus spinosa* L.

Es war nicht möglich, die Blätter derselben Pflanzen zu sammeln, von denen auch F. Richthammer seine Droge geholt hatte. Das im Stadtgebiet liegende Grundstück war nämlich in der Zwischenzeit bebaut worden.

Aus diesem Grunde habe ich im Juni 1958 in der Umgebung von Langquaid 6 kg Frischdroge gesammelt, die 900 g trockenes Material ergab.

Der zur Isolierung eingeschlagene Weg war an die von F. Richthammer angegebene Methode angelehnt. Das Verfahren der Emulgierung des wäßrigen Extraktes haben wir beibehalten, konnten aber

die langwierigen Vorextraktionen mit Petroläther und Chloroform ersparen. Es war uns möglich, einen großen Teil der Ballaststoffe durch Verdünnen mit Wasser und Abkühlen zu entfernen. Die Hauptmenge des Glykosides gewannen wir dadurch, daß wir den wäßrigen Extrakt stark einengten und ihn 4 Wochen in den Kühlschrank stellten. Die braunen, amorphen Ausscheidungen wuschen wir nach dem Abfiltrieren mit viel Wasser und wenig Methanol. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus heißem Methanol und Wasser gelangten wir zu 1,1 g des Glykosides.

Das Umkristallisieren führten wir nach den von F. Richthammer angegebenen Richtlinien durch. Die vereinigten Mutterlaugen bewahrten wir auf.

III. Identifizierung des aus den Blättern von *Prunus spinosa* L.

nachisolierten Hauptglykosides als Kämpferol-3,7-dirhamnosid

Als erstes untersuchten wir den S c h m e l z p u n k t des neu isolierten Stoffes, der von F. Richthammer mit 216-217° C angegeben wurde. Es ergab sich ein exakter Wert von 188-189° C.

Das von F. Richthammer isolierte Produkt begann bei derselben Temperatur zu schmelzen; bis zum endgültigen Zusammensintern zog es sich aber noch 10-15° C hin.

Der Mischschmelzpunkt der beiden Glykoside zeigte keine Depression. Der Mischschmelzpunkt mit dem von L. STICH³⁸⁾ aus Flores Tiliae DAB 6 isolierten Kämpferol-3,7-dirhamnosid und dem von mir aus den Blüten von *Prunus spinosa* L. gewonnenen Kämpferol-3,7-dirhamnosid führte ebenfalls zu keiner Depression.

Als A g l y k o n bestätigten wir durch den Schmelz- und Mischschmelzpunkt von 270-272° C und durch die gleichen Daten des Azetates mit 179-181° C K ä m p f e r o l .

Die Maxima des U V - A b s o r p t i o n s s p e k t r u m s mit 265 mμ und 242 mμ stimmten mit den von F. Richthammer angegebenen Werten überein.

38) STICH, L.: Dissertation, München 1958

Bei der Bestimmung der Zucker war darauf zu achten, daß das Glykosid durch das Einwirken der Säure nicht verändert wurde. Aus diesem Grunde hydrolysierten wir 20 mg Glykosid durch einstündiges Erhitzen in 10 ml 1%iger HCl auf dem siedenden Wasserbad. Um auch Störungen durch den Dowex auszuschalten, neutralisierten wir jeweils 1/3 der Lösung mit Barytwasser, Silberoxyd und Dowex. In allen Fällen fanden wir chromatographisch in PÄW nur R h a m - n o s e mit einem R_F -Wert von 0,6 als Zucker.

Einen erneuten Hydrolyseversuch führten wir mit 2%iger Schwefelsäure durch. Nach einstündigem Erhitzen auf dem Wasserbad wurde mit Barytwasser neutralisiert. Auch hier konnten wir nur R h a m - n o s e nachweisen.

So steht als Aglykon K ä m p f e r o l und als Zuckeranteil R h a m n o s e fest.

Zur weiteren Identifizierung wurde das I R - S p e k t r u m angefertigt, das in folgender Abbildung 5 (S. 27) zusammen mit dem Spektrum des von L. STICH³⁹⁾ aus Flores Tiliae DAB 6 isolierten Kämpferel-3,7-dirhamnosids dargestellt ist. Die eingehende Diskussion des IR-Spektrums befindet sich im IR-Teil auf Seite 28-32.

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

Molekulargewicht der Summenformel $C_{27}H_{30}O_{14} = 578,51$.

Ber. C : 56,05% gef. C : 53,68%

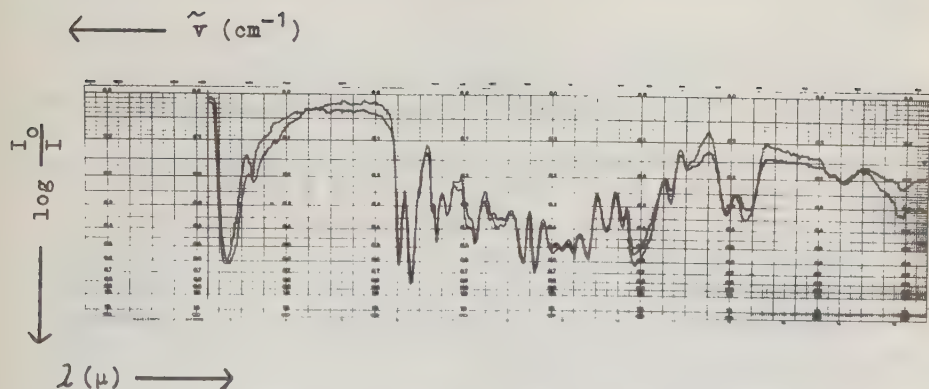
Ber. H : 5,23% gef. H : 5,35%.

Zur Klärung der Zuckerstellung führten wir eine Methylierung in der von L. Stich beschriebenen Weise durch. Der Schmelzpunkt des Methylproduktes lag bei 293-295° C, was den 5,4'-Methyläther anzeigt.

Die weiteren Untersuchungen des Glykosides, wie Darstellung des Osazons, partielle Hydrolyse, UV-spektrophotometrische Messungen im Natriumazetatmilieu usw., führten wir analog der Identifizierung von Glykosid 5 durch. Die gefundenen Werte stimmten in allen Fällen überein.

³⁹⁾ STICH, L.: Dissertation, München 1958

Abb. 5



Überlagerungsaufnahme der IR-Spektren von
Kämpferol-3,7-dirhamnosid aus Flores Tiliae
DAB 6 (stärkere, tiefere Bande) und dem
Hauptglykosid aus den Blättern von Prunus
spinosa L. (schwächere, höhere Bande)
Konzentrationen: 920 γ /300 mg KBr
1222 γ /300 mg KBr

Damit ist die Verbindung, wie auch Glykosid 5, eindeutig
als K ä m p f e r o l - 3 , 7 - d i r h a m n o s i d i d e n t i -
fiziert.

IV. Hydrolyse der Mutterlaugen des Glykosides

Wir zeigten, daß dieses Glykosid als Zucker nur Rhamnose
trägt. Da aber F. Richthammer eindeutig Arabinose nachgewiesen hat,
lag es nahe, den Grund für diesen Trugschluß zu suchen.

Da es gelang, Veränderungen am Glykosid im Verlauf der Be-
arbeitung auszuschalten, steht nur noch die Möglichkeit einer
Verunreinigung desselben offen. Begleitstoffe, die nach einer so
langen Bearbeitung noch nicht abgetrennt sind, haben in der Regel
dem Flavon sehr ähnliche physikalische Eigenschaften und sind oft
in den Mutterlaugen angereichert. Aus diesem Grunde unterwarfen

wir den beim Umkristallisieren angefallenen Rückstand einer Hydrolyse.

Wir verwendeten 2%ige Schwefelsäure und neutralisierten mit Barytwasser. Das Zuckerchromatogramm zeigte uns Rhamnose, Arabinose und Xylose, wobei besonders die Arabinose stark hervortrat.

Die beiden zuletzt genannten Zucker dürften wahrscheinlich die Hydrolyseprodukte eines Pflanzenschleimes sein, der als Verunreinigung in den Blättern von *Prunus spinosa* L. enthalten ist. Es ist bekannt, daß solche Schleime bei der Hydrolyse meist Pentosen ergeben. Bekräftigt wird diese Auffassung noch dadurch, daß in den Blüten der gleichen Pflanze die gleichen Zucker zusätzlich gefunden wurden.

F. Richthammer hat die aus dem Schleim stammende Arabinose dem Glykosid zugeordnet. Der schleppende Schmelzpunkt läßt sich auch als Folge dieser Begleitsubstanz erklären.

D. UNTERSUCHUNG DER INFRAROTSPEKTREN EINIGER KÄMPFEROLABKÖMMLINGE

Nachdem die Kämpferolderivate einen großen Prozentsatz der vorkommenden Flavonglykoside darstellen, lag es im Hinblick auf weitere systematische Arbeiten nahe, die gesetzmäßigen Zusammenhänge zwischen deren Struktur und den IR-Spektren zu klären. Die strukturell sehr ähnlichen Quercetinglykoside wurden in die Untersuchungen nicht mit einbezogen.

I. Die Carbonylbande der Kämpferole

Wie alle Flavone und Flavonole⁴⁰⁾⁴¹⁾ zeigen auch die Kämpferolabkömmlinge ihre stark ausgeprägte Carbonylbande bei der Wellenzahl 1650 - 1670 cm^{-1} . Daneben beobachten wir noch bei der Wellen-

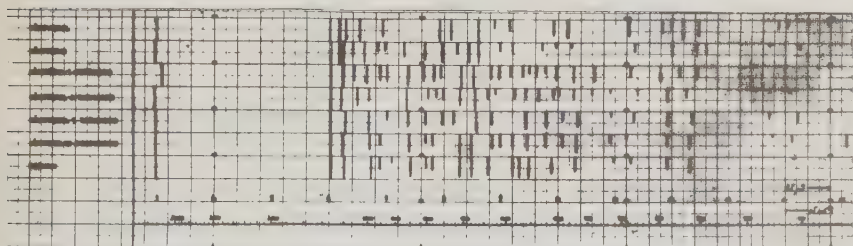
40) HERGERT, H.L. u. KURTH, E.F.: J.Amer.chem.Soc. 75, 1622 (1953)

41) HÖRHAMMER, L., WAGNER, H. u. GLOGGENIESSER, F.: Arch.Pharmaz. Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 291/63, 126 (1958)

zahl 1600 cm^{-1} eine Bande, die die erstgenannte übertrifft. Diese scheint für Flavonole charakteristisch zu sein. Sie ist bei Kämpferolabkömmlingen besonders ausgeprägt.

Alle Absorptionsbanden der von uns untersuchten Substanzen sind in folgender Abbildung 6 festgehalten. Jede Bande wird durch eine Linie, deren Länge proportional der Intensität ist, charakterisiert. Die Intensität der Carbonylbande wird mit 100% festgesetzt.

Abb. 6



Strichdiagramme der 6 untersuchten Kämpferolderivate

II. Untersuchung der γ -Schwingungen (out of bending)

Wichtige Hinweise liefern die γ -Schwingungen des IR-Spektrums im Bereich der Wellenzahlen zwischen 875 und 800 cm^{-1} . In der folgenden Tabelle 1 sind die Wellenzahlen der wichtigsten Banden für die einzelnen Kämpferolabkömmlinge angegeben. (siehe S. 30).

Aus der von H. DANNENBERG und Mitarbeitern⁴²⁾ angegebenen Zuordnungstafel geht hervor, daß für para-Disubstitution Banden bei den Wellenzahlen 837 und 798 cm^{-1} vorhanden sein müssen. Auch den Seitenphenylring des Kämpferols kann man als paradisubstituierten Benzolring auffassen. Daraus erklären sich die starken Banden, die wir bei unseren Flavonen zwischen 820 und 840 cm^{-1} fanden.

42) DANNENBERG, H., SCHIEDT, U. u. STEIDLE, W.: Z. Naturforsch. 8b, 269 (1953)

T a b e l l e 1

Flavon	Banden ^{*)} im Bereich von 850-795 cm ⁻¹		
Kämpferol ^{**) ..}	<u>820</u>	795	
Kämpferid (3,5,7-Tri-hydroxy-4'-methoxyflavon)	<u>833</u>	810	(schwach)
Kämpferol-3-arabinosid	<u>847</u>	824	803
Kämpferol-3-rhamnosid	<u>837</u>	815	
Kämpferol-7-rhamnosid	<u>837</u>	810	
Kämpferol-3,7-dirhamnosid	837	<u>812</u>	
Robinin	840	<u>810</u>	

Daneben untersuchten wir den Wellenbereich zwischen 850 und 900 cm⁻¹, wobei alle untersuchten Substanzen eine Bande zwischen 882 und 892 cm⁻¹ aufwiesen. Diese ist wahrscheinlich auf den Einfluß der Schwingungen des Chromongerüstes zurückzuführen. Das Aglykon Kämpferol besitzt zusätzlich Banden bei 848 und 835 cm⁻¹. Ist die OH-Gruppe am Kohlenstoffatom 7 verglykosidiert, so finden wir außerdem zwischen 910 und 916 cm⁻¹ eine schwache Absorption.

Beim Kämpferol^{**) ..} treten in diesem Bereich der γ -Schwingungen zwei ausgeprägte Banden mit den Werten 820 cm⁻¹ und 795 cm⁻¹ auf, wobei erstere etwas überwiegt.

Im Gegensatz dazu zeigt das Kämpferid bei 833 cm⁻¹ eine einzige starke Bande; die zweite bei 810 cm⁻¹ ist nur angedeutet.

Das Kämpferol-3-arabinosid hat in diesem Gebiet drei Maxima; das tiefste bei 847 cm⁻¹ gefolgt vom zweitstärksten bei 810 cm⁻¹. Zwischen beiden liegt noch eine Bande geringerer Intensität bei 824 cm⁻¹.

Die folgenden vier in der Tabelle 1 angeführten Glykoside (Kämpferol-3-rhamnosid, Kämpferol-7-rhamnosid, Kämpferol-3,7-dirhamnosid und Robinin) weisen gemeinsam je eine Bande zwischen

*) Die unterstrichenen Banden sind jeweils stärker ausgebildet als die übrigen.

**) Kämpferol wurde zu konzentriert gemessen, so daß die Lage der .. Banden nicht sicher ist.

837-840 cm^{-1} und 810-815 cm^{-1} auf. Die Monoglykoside dieser Verbindungen besitzen um 840 cm^{-1} den dominierenden Wert. Bei den Diglykosiden Kämpferol-3,7-dirhamnosid und Robinin, die beide in 3,7-Stellung verglykosidiert sind, ist die zweite Bande etwas stärker ausgeprägt.

Die Banden bei 837 cm^{-1} und 810-812 cm^{-1} scheinen bei Kämpferolglykosiden sowohl auf die C-7- als auch auf die C-3,7-Verglykosidierung hinzuweisen. Auch bei Kämpferol-3-rhamnosid tritt diese Kombination auf, nicht aber bei Kämpferol-3-arabinsid, so daß sie für die C-3-Verglykosidierung nicht typisch sein kann.

III. C-O-Valenzschwingungen der Zuckeranteile

Die C-O-Valenzschwingungen der Zucker liegen zwischen 950 und 1100 cm^{-1} . L. HÖRHAMMER und Mitarbeiter⁴³⁾ haben festgestellt, daß die Intensität der C-O-Schwingungen der Anzahl der im Flavonmolekül enthaltenen Zucker entspricht. Es ist also möglich, zwischen Aglykonen, Mono- und Di- oder Triglykosiden zu unterscheiden.

In der folgenden Tabelle 2 haben wir die in dem angegebenen Bereich auftretenden Banden festgehalten.

T a b e l l e 2

Flavon	Wellenzahlen in cm^{-1} ; Banden*)				
	1	2	3	4	
Kämpferid	1084	1030	1007	978	
Kämpferol-3-arabinsid	1090	1066 1053	1042 1021	1004	973
Kämpferol-3-rhamnosid	1082	1058	1006	974	
Kämpferol-7-rhamnosid	1088	1062	1022	995	970
Kämpferol-3,7-dirhamnosid	1087	1058	1022	994	970
Robinin	1074	1059	1023	1007	970

Banden der C-O-Valenzschwingungen im Wellenbereich zwischen 950 und 1100 cm^{-1}

43) HÖRHAMMER, L., WAGNER, H. u. GLOGGENGIESSER, F.: Arch.Pharmaz. Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 291/63, 126 (1958)

*) Die wichtigsten Banden der in der Tabelle aufgeführten Glykoside wurden von 1 - 4 numeriert.

Um eine Vorstellung über die Intensität derselben zu geben, sind die Kurven dieses Bereiches in Abb. 7 und 8 wiedergegeben.

Die annähernden Werte können auch der Abbildung 6 auf Seite 29 entnommen werden.

Kämpferid, das 4'-Methoxykämpferol, besitzt in diesem Bereich keine starke Absorption, da es keinen Zucker trägt (siehe Abb. 6, S. 29 und Abb. 7).

Abb. 7

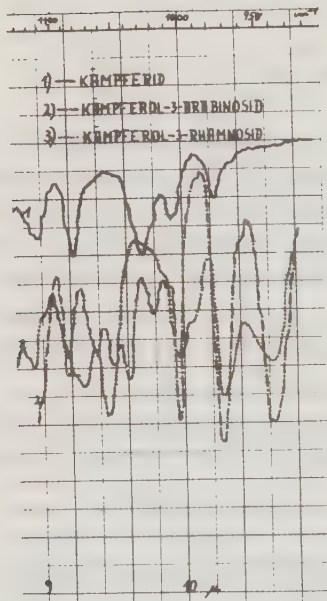
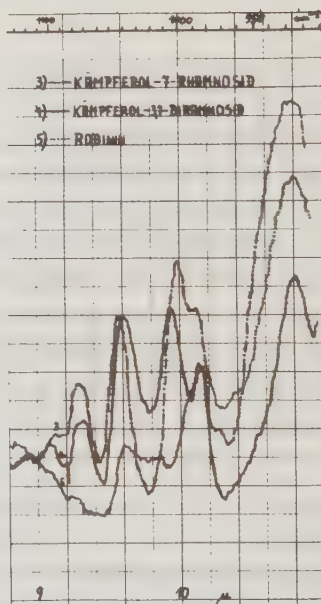


Abb. 8



Infrarotspektren der untersuchten Kämpferolabkömmlinge im Bereich der C-O-Valenzschwingungen

Beim Kämpferol-3-arabinosid fallen die drei stark ausgebildeten Maxima 940 , 973 und 1004 cm^{-1} auf. Das mittlere überwiegt etwas. Es folgen dann einige kleinere Banden und zwar bei 1021 , 1042 , 1053 , 1066 und 1090 cm^{-1} . Diese Gruppierung, drei stark ent-

wickelte und die folgenden kleineren Banden, dürfte für ein Kämpferol-arabinosid charakteristisch sein (siehe Abb. 6, S. 29 und Abb. 7, S. 32).

Die Verbindungen des Kämpferols mit Rhamnose weisen bei 970-974, bei 1020-1023, bei 1058-1063 und bei 1074-1088 cm^{-1} gemeinsame Banden auf. Letztere Bande ist allerdings nur schwach ausgebildet. Typisch erscheint uns ferner eine schwach angedeutete Einbuchtung bei 995-1009 cm^{-1} , die bei dem Diglykosid Kämpferol-3,7-dirhamnosid und dem Triglykosid Robinin stärker hervortritt (siehe Abb. 6, S. 29, Abb. 7 u. 8, S. 32).

Beim Kämpferol-3-rhamnosid sind die normalerweise bei 1022 und 995 cm^{-1} auftretenden Banden zu einer einzigen bei 1006 cm^{-1} zusammengefaßt. Bei 995 cm^{-1} ist nur eine minimale Einbuchtung feststellbar (siehe Abb. 6 u. 7).

Die Banden 1 und 4 der Kämpferolmonorhamnoside sind ungefähr gleich stark entwickelt. Die zwischen beiden liegende Absorption ist bei Kämpferol-3-rhamnosid schwächer, bei Kämpferol-7-rhamnosid stärker ausgebildet als die begleitenden Banden (siehe Abb. 6, 7 u. 8).

Im Gegensatz dazu ist bei den Di- bzw. Tri-kämpferolrhamnosiden die Bande 3 stärker entwickelt, so daß sie etwa gleich stark mit Bande 2 ist (siehe Abb. 6 und 8).

Diese Befunde können eventuell zu einer Unterscheidung von Kämpferol-mono- und Kämpferol-dirhamnosiden herangezogen werden. Ist Bande 1 und 4 etwa gleich stark, 3 nur angedeutet, 2 dagegen wesentlich stärker oder schwächer, so handelt es sich um ein Kämpferol-monorhamnosid. Wenn die Bande 3 gleich stark wie Bande 2 entwickelt ist, so haben wir es mit einem Kämpferol-dirhamnosid zu tun.

Wie Abbildung 8 zeigt, besitzt das Robinin zwischen 950 und 1100 cm^{-1} eine stärkere Bande, weil es als dritten Zucker noch Galaktose trägt. Die Maxima sind deshalb nicht mehr so ausgeprägt, aber noch gut zu erkennen.

IV. Zusammenfassung und Diskussion der Unterscheidungsmöglichkeiten von Kämpferolabkömmlingen durch IR-Spektren

Eine Unterscheidung der verschiedenen Kämpferolabkömmlinge an Hand der IR-Spektren ist möglich. Kämpferol und Kämpferid besitzen im Bereich der Wellenzahlen zwischen 970 und 1100 cm^{-1} keine starke Absorption. Im Bereich der γ -Schwingungen hat Kämpferol zwei starke Maxima bei 820 und 795 cm^{-1} . Im Gegensatz dazu zeigt Kämpferid bei 833 cm^{-1} eine einzige starke Bande.

Die Kämpferolglykoside besitzen gemeinsam jeweils eine Bande im Bereich der γ -Schwingungen bei 837-847 cm^{-1} und bei 810-824 cm^{-1} . Bei den Monoglykosiden ist die erste Bande, bei den Diglykosiden letztere dominierend. Das Kämpferol-3-arabinosid erkennt man an seinen drei im C-OH Bereich gelegenen stark ausgebildeten Maxima, denen mehrere schwächere folgen. Die Kämpferolrhamnoside besitzen in diesem Bereich vier charakteristische Maxima und zwar um 970, 995, 1020, 1060 und 1080 cm^{-1} . Nur Kämpferol-3-rhamnosid hat zwischen 1020 und 995 cm^{-1} ein Absorptionsmaximum, wodurch es sich vom Kämpferol-7-rhamnosid unterscheidet. Die Kämpferoldirhamnoside geben sich durch die im Bereich der γ -Schwingungen gelegenen Absorptionen bei 812 cm^{-1} , die im Gegensatz zu den Kämpferolmonorhamnosiden über die bei 837 cm^{-1} dominieren, zu erkennen. Diese Gruppierung scheint auf die C-7- bzw. auf die C-3,7-Verglykosidierung der Kämpferolrhamnoside hinzuweisen.

E. PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FLAVON- FÜHRUNG DER BEKANNTESTEN ROSACEEN

Bei der Bearbeitung der Flavone aus Blättern und Blüten von *Prunus spinosa* L. sind wir nur auf Kämpferol- und Quercetin-glykoside gestoßen. R. COBET⁴⁴⁾ hat bei der Untersuchung diuretisch wirkender Drogen des DAB 6 und des Ergänzungsbandes zum DAB 6 auf Flavone auch einige Rosaceen mitbehandelt. Die Hydrolyse dieser Pflanzenteile ergab als Aglykone fast nur Kämpferol und Quercetin. Es war nun naheliegend, auch einen Teil der anderen Vertreter der Rosaceen auf ihre Flavonführung zu untersuchen.

I. Sammeln und Extrahieren des Materials

Die zu untersuchenden Pflanzenteile sammelten wir im Frühjahr und Sommer des Jahres 1957 hauptsächlich im Botanischen Garten in München. Ein geringerer Teil stammte auch aus der Umgebung von München und Langquaid.

Die bei trockenem Wetter gesammelten Drogen trockneten wir an der Luft und zerkleinerten sie anschließend.

Einem Teil entzogen wir die Inhaltsstoffe durch 14tägiges Mazerieren in Methanol, ein kleinerer Teil wurde im Soxhlet extrahiert.

Durch Destillation ist der Extrakt vom Lösungsmittel befreit worden. Den Rückstand nahmen wir mit heißem Wasser auf und entfernten durch Filtrieren die in Wasser unlöslichen Stoffe.

II. Hydrolysemethoden zur Bestimmung der Aglykone

Die Hydrolysen führten wir entweder direkt aus dem wässrigen Extrakt oder aber nach dem Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln durch.

Bei vielen Extrakten war schon durch einen Salzsäuregehalt von 2% in wässriger Lösung ein einwandfreies Resultat zu erzielen.

44) COBET, R.: Dissertation, München 1957

In ca. 30% der Fälle arbeiteten wir mit 5 ml des methanolischen Extraktes, 5 ml Wasser und 10 ml 10%iger Schwefelsäure unter einstündigem Erhitzen am Rückflußkühler. Diese Methode führte bis auf zwei Ausnahmen immer zum Ziel. In den Ausnahmefällen ist die Methode nach Kiliani angewandt worden.

III. Lösungsmittel zur Chromatographie

Zur Bestimmung der Aglykone verwendeten wir das System Isopropanol-Ameisensäure-Wasser, 2+5+5. Zum Vergleich ließen wir die bekannten Aglykone mitlaufen und suchten dann mit Hilfe der R_f -Werte und durch Besprühen die Identifizierung der gefundenen Stoffe zu ermöglichen.

Die wässerigen Extrakte sind in der Regel mit Essigester oder mit Essigester und einem Zusatz von 5% Methanol ausgeschüttelt worden. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels trugen wir die Fraktionen zusammen mit dem wässerigen Extrakt und Testsubstanzen auf unser Chromatogrammpapier auf. Das Entwickeln erfolgte in folgenden Lösungsmittelsystemen:

1. Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser
2. Butanol-Eisessig-Wasser
3. Isopropanol-Ameisensäure-Wasser

IV. Besprühen der Chromatogramme

Die Chromatogramme wurden zuerst unbesprüht im UV-Licht betrachtet, die Beobachtungen markiert und angezeichnet. Um festzustellen, ob es sich um Flavone handelt, besprühten wir ein Chromatogramm mit 5%iger Aluminiumsulfatlösung. Nach dem Besprühen mit basischer Bleiazetatlösung war meist unter Berücksichtigung der gefundenen Aglykone die Zuordnung der Glykoside möglich. In besonderen Fällen hat der Zirkon-Zitronensäure-Test auf dem Papier zur Charakterisierung der Glykoside wertvolle Hilfe geleistet.

V. Zeichenerklärung

In der folgenden Tabelle 3 sind die bei der systematischen Untersuchung der Rosaceen gefundenen Flavone angeführt. Für die tabellarische Zusammenstellung verwendeten wir folgende Abkürzungen:

g = gelb	gg = gelbgrün	r = rot
or = orange	d = dunkel	o = ocker

Fortsetzung:

T a b e l l e 3

Stammpflanze	Autor	Pflanzen- teil	Aglykone	Quercetin- glykoside	Kämpferol- glykoside	Stoffe ohne Vergleichssubstanz	R _f -Wert in BEW	R _f -Wert in AAW
Rubus idaeus	L.	Folia	x					
Sanguisorba minor	Scop.	Folia	x					
Sanguisorba offic.	L.	Folia	x					
Sorbus aucuparia	L.	Folia	x					
Sorbus aucuparia	L.	Flores (x)	x					
Sorbus aucuparia	L.	Fructus	x					
Spiraea arguta	Zbl.	Flores	x					
Spiraea arguta ⁴⁶⁾	Zbl.	Folia	x					
Spiraea media ⁴⁶⁾	Schmidt	Folia	x					
Spiraea media	Schmidt	Flores	x					
				Kämpferol				
				Quercetin				
				Isorhamnetin				
				Vitexin				
				Vitexin-4'-rhamnosid				
				Rutin				
				Isorhamnetin				
				Hyperosid				
				Quercitrin				
				Kämpferolrhamnoglukosid				
				Kämpferoldirhamnosid				
				Kämpferol-3-arabinosid				
				Kämpferol-3-rhamnosid				
				Kämpferol-3-glukosid				
				Isorhamnetin- rhamnoglukosid				
				Farbe unbesprüht im UV-Licht				
				Farbe mit Aluminium- sulfatlösung				
				Farbe mit basischer Bleiazetatlösung				
				R _f -Wert in BEW				
				R _f -Wert in AAW				

VI. Zusammenfassung der papierchromatographischen Untersuchung der Rosaceen

Die systematische Untersuchung erstreckte sich hauptsächlich auf e i n h e i m i s c h e Vertreter der Familie der Rosaceen. Bei den 41 bearbeiteten Arten wurden von 12 Vertretern sowohl die Blüten als auch die Blätter untersucht. Außerdem untersuchten wir 2 Rhizome und einen Samen, also insgesamt 46 Pflanzenteile. In allen anderen Fällen bearbeiteten wir die Blätter.

In Tabelle 3 (S. 37-40) sind drei Vertreter aus der Unterfamilie der Spiraeoideae und fünf der Pomoideae enthalten. Die Prunoideae wurden von H. J. ARNOLD⁴⁷⁾ eingehend bearbeitet. Alle übrigen untersuchten Pflanzen gehören der weitverbreiteten Unterfamilie der Rosoideae an, von denen insbesondere viele Potentilla- und Rosa-Arten untersucht wurden.

Unter den 46 Partien waren in drei Fällen keine Flavone zu finden und zwar in: Rhizoma Tormentilla, Semen Cydoniae und im Rhizom von Geum rivale.

Als Vergleichssubstanzen zur Untersuchung der hydrolysierten Extrakte auf A g l y k o n e verwendeten wir Kämpferol, Quercetin, Isorhamnetin und Vitexin. Vitexin war nur in den Blättern und Blüten von Crataegus monogyna Jacq. enthalten. Isorhamnetin fanden wir bei drei Spiraea-Arten. Bei den Aglykonen war die in 29 Fällen festgestellte Kombination Kämpferol und Quercetin überwiegend. Quercetin als alleiniges Aglykon stellten wir fünfmal fest, wogegen Kämpferol nur zweimal auftrat. Isorhamnetin war in den drei Fällen mit Kämpferol und Quercetin vergesellschaftet. Neben Vitexin war immer Quercetin enthalten.

Sämtliche G l y k o s i d e gehören dem ubiquitären Typ der C-3-verglykosidierten Flavone an. Die meisten sind Kämpferol- bzw. Quercetin-Abkömmlinge. Insgesamt wurden 61 Quercetin- und 45 Kämpferolglykoside gefunden.

Am häufigsten trat Hyperosid (Quercetin-3-galaktosid) auf. Dieses war in 24 Pflanzenteilen enthalten. Es folgten bei den

47) ARNOLD, H.J.: Dissertation, München 1956

Quercetinabkömmlingen Rutin mit 16, Isoquercitrin mit 12 und Quercitrin mit 9 Positionen.

Unter den 45 Kämpferolglykosiden fanden wir 19mal Kämpferol-3-glukosid, 11mal Kämpferol-3-rhamnosid, 10mal Kämpferol-3,7-dirhamnosid, 3mal Kämpferol-3-rhamnoglukosid und 2mal Kämpferol-3-arabinosid.

Spiraeosid, das von W. ENDRES⁴⁸⁾ in vielen Spiraea-Arten gefunden wurde, war in unserem Pflanzenmaterial nicht enthalten, ebenso wenig Kämpferol-7-rhamnosid, das in manchen Prunus-Arten gefunden wurde.

Flavonverbindungen, die wir nicht zuordnen konnten, waren enthalten in: Blättern und Blüten von *Alchemilla mollis*, in den Blättern und Blüten des Apfelbaums, in den Blättern von *Potentilla grandiflora*, in den Blättern und Blüten von *Potentilla verna* und in den Blüten von *Rosa canina* und *Rosa centifolia*.

Vitexin-4'-rhamnosid war neben Vitexin nur in den Blättern und Blüten von *Crataegus monogyna* Jacq. enthalten. Das Bemerkenswerte dieser Verbindung ist das Auftreten eines direkt über eine Kohlenstoffbrücke ans Molekül gebundenen Hexylrestes. Eine derartige Verknüpfung tritt in der Natur nur selten auf.

F. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON FREIEN ZUCKERN IN DEN BLÜTEN VON PRUNUS SPINOSA L.

Im Zuge der Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von *Flores Pruni spinosae* wollten wir auch die in der Droge enthaltenen freien Zucker feststellen.

I. Ausgangsmaterial und dessen Vorreinigung

Als Ausgangsmaterial fand der wäßrige Extrakt, aus dem die schon untersuchten Flavone ausgeschüttelt worden waren, Verwendung. Durch Zusatz von überschüssigem basischem Bleiazetat

⁴⁸⁾ ENDRES, W.: Dissertation, München 1955

ist ein großer Teil der anhaftenden Verunreinigungen abgeschieden worden.

II. Papierchromatographie

Den so vorbereiteten Extrakt chromatographierten wir in PEW. Nach dem Besprühen mit Anilinphthalat zeigte sich nur ein Punkt, der einen etwas tieferen R_F -Wert als die Glukose hatte. Wegen mehrerer Begleitsubstanzen und der daraus resultierenden R_F -Depression war es nicht möglich, den Punkt einer Testsubstanz zuzuordnen. Als Testsubstanzen fanden Fruktose, Glukose, Galaktose und Sedoheptulose Verwendung. Beim Besprühen mit dem Orzin-Reagens auf Ketosen nach R. KLEVSTRAND und A. NORDAL⁴⁹⁾ leuchtete authentische Sedoheptulose in charakteristischem Blaugrün, während unser Punkt eine gelbliche Farbe annahm. Diese Substanz war also ausgeschlossen.

III. Isolierung der Substanz

Mit Hilfe der Papierchromatographie waren keine Ergebnisse mehr zu erzielen. Zur weiteren Reinigung des Extraktes sind nun Ionenaustauscher herangezogen worden. Als ersten Schritt zur Reinigung behandelten wir unsere Zuckerlösung mit dem Anionenaustauscher Permutit C, um ihn anschließend über den Kationenaustauscher Dowex 2 zu geben. Auf diese Weise erzielten wir eine gute Reinigung. Der Zucker konnte nun auf dem Chromatogramm mit großer Sicherheit der Glukose zugeordnet werden.

IV. Identifizierung des Zuckers durch das Osazon

Mit Phenylhydrazin fällten wir aus dem Extrakt den Zucker als Osazon aus. Schon nach wenigen Minuten der Abkühlung war eine große Menge nadelartiger Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 204-205° C ausgefallen. Dieser ist für Fruktose und Glukose charakteristisch.

Um eine Entscheidung zu treffen, haben wir die authentischen Osazone der Fruktose und Glukose angefertigt. Der Misch-

49) KLEVSTRAND, R. u. NORDAL, A.: Acta chem.scand. 4, 1320 (1950)

schmelzpunkt mit Fruktose ergab eine deutliche Depression, während der mit Glukose ebenfalls zwischen 204° und 205° C lag.

Damit ist in Flores Pruni spinosae als freier Zucker eindeutig G l u k o s e identifiziert.

G. UNTERSUCHUNG DER IM UV-LICHT BLAU FLUORESZIERENDEN STOFFE AUS DEN BLÜTEN VON PRUNUS SPINOSA L.

I. Isolierung dieser Stoffe

Schon bei der Isolierung der Flavone aus den Blüten von Prunus spinosa L. ist die große Zahl der im UV-Licht blau fluoreszierenden Stoffe aufgefallen. Bei der Bearbeitung der Flavonglykoside sind diese Substanzen als Begleitstoffe angefallen.

Unser Gemisch war mit geringen Mengen Flavonen verunreinigt. Um eindeutige Chromatogramme zu erhalten, mußten diese entfernt werden. Zu diesem Zweck verwendeten wir die Chromatographie an Perlonsäulen und zwar eine Säule mit 30 cm Höhe und 2,5 cm Durchmesser. Wir eluierten mit 3,7 l Wasser, wobei alle blau fluoreszierenden Stoffe vorausliefen, während die übrigen Substanzen am Perlon festgehalten wurden. Beim nächsten Versuch verwendeten wir eine Säule mit nur 9 cm Höhe und 7 cm Durchmesser. Das Resultat blieb gleich gut.

II. Chromatographie der isolierten Stoffe

Zur Papierchromatographie verwendeten wir die Systeme Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (ÄAW), Eisessig-Wasser (EW), IAW und BEW. Die erstgenannten Lösungsmittelgemische zeigen keine gute Trennung der zu untersuchenden Stoffe. Lediglich BEW ergab eine befriedigende Differenzierung, weshalb wir alle Chromatogramme in diesem Gemisch laufen ließen.

III. Untersuchung mit Sprühreagenzien auf dem Papier

Die in BEW entwickelten Chromatogramme beobachteten wir zuerst unbesprüht im UV-Licht. Im Anschluß daran ließen wir Ammoniakdämpfe einwirken. Das Besprühen der Chromatogramme mit 2n Kalilauge in methanolischer Lösung führte zu den gleichen Fluoreszenzfarben wie sie sich auch beim Behandeln mit Ammoniakdämpfen gezeigt hatten.

Das mit Kalilauge vorbehandelte Chromatogramm besprühten wir mit einem Gemisch von Natriumnitrit und Natriumsulfanilat in salzsaurer Lösung.

Die R_f -Werte in BEW und die auftretenden Farben und Fluoreszenzfarben sind in der folgenden Tabelle 4 aufgeführt.

T a b e l l e 4

Subst.	R_f -Wert in BEW	unbespr. i. UV-Licht	Ammoniak UV-Licht	KOH im UV-Licht	Sulfanilsäure- reagens
1	0,92	blau	blau	blau	rot
2	0,85	blau	blau	blau	fahl
3	0,77	blau	blau	blau	rot
(4)	0,69	blau	blau	blau	orange
5	0,65	blau	grüngelb	grüngelb	rotviolett
6	0,55	blau	gelb	gelb	fahl
7	0,49	blau	blau	blau	rot
(8)	0,41	blau	(gelb)	gelblich	fahl

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß die Stoffe 4 und 8 quantitativ nicht stark hervortreten. Am stärksten vertreten sind die Substanzen 2, 5 und 6.

IV. Saure und alkalische Hydrolysen

Hydrolyseversuche mit 5- bzw. 10%iger Salzsäure führten zu keinem guten Ergebnis, da im ersteren Fall die Hydrolyse nicht

quantitativ verlaufen war, im letzteren aber kein blauer Punkt mehr unter der UV-Lampe festgestellt werden konnte. Die Hydrolyse mit 10%iger Kalilauge in wäßriger Lösung erhitzen wir 1 Stunde, neutralisierten mit Salzsäure und schüttelten mit Äther und Essigester aus. Die Hydrolyseprodukte waren im Äther enthalten.

Die Ätherausschüttelung chromatographierten wir in IAW, in BEW und in LAW. Nur in letzterem Lösungsmittelgemisch war eindeutig zu erkennen, daß es sich um zwei Stoffe handelt.

Die in den verschiedenen Laufmitteln gefundenen R_f -Werte sind in folgender Tabelle 5 zusammengestellt.

T a b e l l e 5

Laufmittel	IAW	BEW	LAW
R_f -Wert 1	0,83	0,86	<u>0,84</u>
R_f -Wert 2	0,83	0,83	<u>0,75</u>

V. Trennung der Hydrolyseprodukte und deren UV-absorptions-spektrophotometrische Untersuchung

Die Hydrolyseflüssigkeit trugen wir auf zwei 40 cm breite Chromatogrammbögen auf und entwickelten in LAW. Die beiden blau fluoreszierenden Zonen wurden mit Methanol eluiert.

Die UV-Absorptionsspektren haben wir im Zeiss-Opton-Spektrophotometer in geeigneter Konzentration aufgenommen. Gemessen wurde in methanolischer Lösung und im Natriumazetatmilieu. In Tabelle 6 sind die gefundenen Werte zusammengefaßt.

T a b e l l e 6

Substanz	Methanol		Natriumazetat		Verschiebung	
	Max _I m μ	Max _{II} m μ	Max _I m μ	Max _{II} m μ	Max _I m μ	Max _{II} m μ
Stoff 1	220	285	220	280	0	- 5
Stoff 2	220	310	220	280	0	-30

Experimenteller Teil

A. Papierchromatographie

1) Lösungsmittelsysteme für Flavone und Zucker

Sämtliche papierchromatographischen Arbeiten wurden mit den ungewaschenen Papieren Nr. 2043b der Firma Schleicher & Schüll absteigend in großen Glaskammern durchgeführt. Wir verwendeten folgende Fließmittel:

- | | | | |
|------------------------------------|-------|----------|------------|
| a) Essigester-Ameisensäure-Wasser | (ÄAW) | (10+2+3) | Oberphase |
| b) Butanol-Eisessig-Wasser | (BEW) | (4+1+5) | Oberphase |
| c) Isopropanol-Ameisensäure-Wasser | (IAW) | (2+5+5) | einphasig |
| d) Pyridin-Essigester-Wasser | (PÄW) | (1+2+2) | Oberphase. |

Die Systeme (a) und (b) zogen wir vor allem zur Trennung der Flavonglykoside heran. Auch im systematischen Teil verwendeten wir sie häufig. Dabei stellte sich heraus, daß (b) eine bessere Differenzierung der Glykoside im Bereich zwischen R_f -Wert 0,3 - 0,6 ergibt. Das Fließmittel (a) trennt im oberen Teil des Chromatogramms schöner auf und hat den Vorteil der größeren Laufgeschwindigkeit. Das Gemisch (c) ist zur Identifizierung der Aglykone geeignet. Aber auch zur Charakterisierung gewisser Glykoside und zur Unterscheidung dieser von den Aglykonen läßt es sich gut verwenden; (d) diente ausschließlich zur Bestimmung der Zucker.

Als Sprühmittel zur Identifizierung der Glykoside, Zucker und Aglykone verwendeten wir folgende Reagenzien:

- 5%ige, wäßrige Aluminiumsulfatlösung
- basische Bleiazetatlösung (Liquor Plumbi subacetici DAB 6)
- Anilinphthalatlösung.

Da wir es hauptsächlich mit Kämpferol- und Quercetinabkömmlingen zu tun haben, ist deren Verhalten im UV-Licht besprüht und unbesprüht wichtig. Ist das Glykosid unbesprüht im UV-Licht braun, so läßt das auf Verglykosidierung des C-3-Atoms schließen; bei Gelbfärbung ist diese Stelle nicht besetzt. Ob ein Kämpferol- oder Quercetinglykosid vorliegt, läßt sich nach Besprühen mit basischer

Bleiazetatlösung unter der UV-Lampe erkennen, wobei erstere gelb, letztere orange erscheinen. Mit Aluminiumsulfatlösung besprühten wir unter anderem die Chromatogramme der Pflanzenextrakte des systematischen Teils.

2) Präparative Papierchromatographie

Diese Methode verwendeten wir zur Trennung der Spaltprodukte der partiellen Hydrolyse von Glykosid 5 und dem Hauptglykosid aus den Blättern von *Prunus spinosa* L. Das Substanzgemisch wurde auf 4 Bogen mit 40 cm Breite aufgetragen und in IAW entwickelt. Die 4 Zonen, bestehend aus Kämpferol-3-rhamnosid, Kämpferol-7-rhamnosid, Kämpferol-3,7-dirhamnosid und Kämpferol, wurden im UV-Licht markiert, die Zonen ausgeschnitten und die zerkleinerten Papierstreifen mit 3mal 100 ml Methanol eluiert.

In ähnlicher Weise suchten wir die Glykoside 6 und 7 zu trennen. Wir trugen den Extrakt auf zwanzig 40 cm breite Bogen auf und ließen 36 Stunden in BEW durchlaufen. Dabei ergab sich noch keine gute Trennung aber doch eine so weitgehende Entfernung der Ballaststoffe, daß anschließend mit kurzen Perlonsäulen und Wasser eine Trennung erzielt wurde.

3) Chromatographische Übersicht der Flavone in den Blüten von *Prunus spinosa* L.

Das Chromatogramm des Rohextraktes zeigte in BEW und in ÄAW von R_f -Wert 0,3 - 0,9 einen durchgehenden Strich. Neben den Flavonen waren noch mehrere blau fluoreszierende Stoffe eingestreut. Durch die verschiedenen Begleitstoffe ist eine Veränderung der Löslichkeitsverhältnisse eingetreten, was auf dem Chromatogramm durch R_f -Depression und Schwanzbildung zum Ausdruck kommt.

B. Bereiten des wäßrigen Extraktes

Zur Bereitung des wäßrigen Extraktes extrahierten wir zunächst 300 g Droge mit 1,5 l Methanol im Soxhlet erschöpfend. Im Anschluß daran dampften wir das Methanol ab und nahmen den Rückstand in 3mal 75 ml Methanol auf. Es entstand eine kolloide, nicht

filtrierbare Lösung, die zur weiteren Bearbeitung nicht geeignet war.

Zur Entfernung der Begleitstoffe, die die kolloiden Lösungen verursachten, schüttelten wir den Extrakt mit 25 x 200 ml Petroläther aus. Darauf verdünnten wir auf etwa das Zehnfache, also auf 2 l, mit Wasser und stellten über Nacht in den Kühlschrank, wodurch aber keine Abscheidung von Ballaststoffen erfolgte. Von dem verdünnten, wäßrigen Extrakt dampften wir dann jeden Tag 100 ml Wasser ab und stellten über Nacht kühl. Dies wurde fortgesetzt bis die Gesamtmenge des Extraktes wieder 200 ml betrug. Bei jedem solchen Schritt wurden nur geringe Mengen der Ballaststoffe abgeschieden.

Zum Schluß emulgierten wir den Extrakt von 200 ml mit der gleichen Menge Chloroform, um die Begleitstoffe beim Zerstören der Emulsion durch Abdampfen des organischen Lösungsmittels auszufällen. Diese von F. RICHTHAMMER⁵⁰⁾ bei den Blättern von *Prunus spinosa* L. durchgeführte Methode führte bei den Blüten der gleichen Pflanze nicht zum Erfolg.

Zur Isolierung der Glykoside mußte ein anderer Weg eingeschlagen werden. Wir extrahierten nun 300 g Droge im Soxhlet erschöpfend mit Äthanol. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels war es uns möglich, den Rückstand in 4 x 75 ml heißem Wasser aufzunehmen, wodurch wir zu einer klaren, gut filtrierbaren Lösung gelangten.

Zur Vorreinigung verdünnten wir mit der zehnfachen Menge Wasser und stellten über Nacht in den Kühlschrank. Bis zum nächsten Morgen waren 100 g einer braunen, amorphen Masse ausgefallen, die keine Flavone enthielt. Nach dem Einengen wurde diese Manipulation wiederholt. Wir konnten nochmals Begleitstoffe abfiltrieren und erzielten so eine weitgehende Vorreinigung.

Der Extrakt zeigte in diesem Zustand einen p_H -Wert von 3,8. Außerdem stellten wir fest, daß bei längerem Stehen die Glykoside hydrolysierten. Grund der Hydrolyse waren Pflanzensäuren, die sich auf dem Chromatogramm als blau fluoreszierende Punkte zu erkennen gaben.

50) RICHTHAMMER, F.: Dissertation, München 1955

Um die Hydrolysetätigkeit der Säuren zu unterbinden, neutralisierten wir den Extrakt mit gesättigter, wäßriger Natriumbikarbonatlösung. Wir stellten auf einen p_H -Wert von 6,95 ein, was die weitere Spaltung verhinderte.

Auf diese Weise behandelten wir 2,25 kg unserer gesammelten Droge.

C. Ausschüttelung mit Äthergemischen

1) Ausschüttelung mit Äther-Petroläther (1+1)

Mit diesem Gemisch war es möglich, die Aglykone von den Glykosiden zu trennen. Dies ist bemerkenswert, weil in dem Extrakt Glykoside enthalten sind, deren R_f -Werte in ÄAW und BEW höher sind als die der Aglykone.

Bei Vorversuchen stellten wir fest, daß bei einem Verhältnis von 80% Petroläther zu 20% Äther weder Glykoside noch Aglykone ausgeschüttelt werden können. Übersteigt der Prozentsatz des Äthers 60%, so werden schon die hochsitzenden Glykoside mit erfaßt. Durch eine Ätherkonzentration zwischen 20 und 50% werden die Glykoside von den Aglykonen getrennt.

Insgesamt schüttelten wir den neutralisierten, wäßrigen Extrakt 50mal mit einem Gemisch aus 250 ml Äther-Petroläther (1+1) aus.

2) Ausschüttelung mit Äther

Mit Äther bzw. mit Äther-20%Essigester erfaßten wir alle Glykoside der Droge bis zu einem R_f -Wert von etwa 0,6. Bei unserer Droge hat sich das Ausschütteln mit Äther und anschließend mit Äther-20%Essigester als zweckmäßig erwiesen. Mit diesen Lösungsmitteln werden praktisch nur die Glykoside bis zum R_f -Wert 0,6 erfaßt, so daß sich eine spezifische Trennung ergibt. Bei Zusatz von weiteren 10% Essigester werden dann alle Flavone einschließlich des Rutins herausgelöst. Um die Glykoside möglichst quantitativ zu erfassen, mußten wir 70mal mit 250 ml Äther und 30mal mit 250 ml Äther-20%Essigester ausschütteln.

D. Ausschüttelung mit Essigester-Methanol-Gemischen

Die noch verbliebenen drei tiefsitzenden Glykoside 5 bis 7 suchten wir durch Variieren der organischen Lösungsmittel zu isolieren. Es konnte aber schon unter C. 2) (S. 50) gezeigt werden, daß ein über 20% hinausgehender Zusatz von Essigester zum Äther alle drei Glykoside gleichzeitig erfaßt. Aus diesem Grund schüttelten wir eine Probe allein mit Essigester aus und chromatographierten jede Ausschüttelung gesondert, weil erfahrungsgemäß in diesem Lösungsmittel in den ersten Fraktionen eine Anreicherung der höhersitzenden Flavone erfolgt. In unserem Fall wurden aber alle Glykoside in gleicher Weise erfaßt, was uns veranlaßte, dem Lösungsmittel 10% Methanol zuzusetzen; dadurch wurde die Ausschüttelung wesentlich beschleunigt. Den größten Teil der Glykoside 5 bis 8 konnten wir dann zusammen mit 40 x 250 ml Essigester-10%Methanol ausschütteln.

E. Ausschüttelung der Extrakte für die systematische Übersicht

Für die Bereitung der Extrakte sind wir von 20-30 g getrocknetem Pflanzenmaterial ausgegangen.

Zum Ausschütteln der Aglykone aus den hydrolysierten Extrakten verwendeten wir Äther, wovon sich 4 x 50 ml in allen Fällen als ausreichend erwiesen.

Die Glykoside schüttelten wir mit Essigester aus, wozu 5 x 100 ml meist genügen. Um auch tiefersitzende Glykoside mit Sicherheit zu erfassen, behandelten wir anschließend mit 5 x 100 ml Essigester-5%Methanol. Der Rückstand wurde chromatographisch mit den Ausschüttelungen verglichen.

F. Isolierung der Glykoside und Aglykone mit Hilfe der Säulenchromatographie

1) Füllen der Säulen

Zur Reinigung und Trennung der Glykoside und Aglykone verwendeten wir die Chromatographie an Perlonsäulen. Dabei fanden Säulen mit einem Durchmesser zwischen 3 und 5 cm Verwendung. Wenn wir mit Methanol oder Methanol-Wasser-Gemischen eluierten, waren Füllhöhen zwischen 30 und 40 cm immer ausreichend. Zur Trennung der Glykoside 6, 7 und 8 verwendeten wir Säulen von nur 10-15 cm Höhe, wobei mit Wasser eluiert wurde.

Vor dem Füllen legten wir eine 1 cm dicke Watteschicht ein. Wir schwemmten das Perlon mit dem auch zum Eluieren verwendeten Lösungsmittel an und gossen das Ganze unter Umrühren in die Säule. Nach dem Absetzen ließen wir das Eluierungsmittel aus dem Hahn abtropfen bis über dem Perlon keine Flüssigkeit mehr stand. Der Extrakt wurde dann sofort vorsichtig aufgetragen und bei einer Ablaufgeschwindigkeit von 20-30 Tropfen pro Sekunde eluiert.

2) Reinigung der Äther-Petroläther-Ausschüttelungen

Bei diesen Ausschüttelungen entfernten wir die störenden Begleitstoffe durch eine Reinigung ohne Säulen. Das gesamte Material versetzten wir nach dem Abdampfen des Methanols mit 150 ml Wasser und erhitzen auf 80-90° C. Sowohl die Aglykone als auch die Begleitstoffe gingen dabei in Lösung. Beim langsamen Abkühlen fielen die hydrophoberen Aglykone bei ca. 45° C aus bevor noch das Löslichkeitsprodukt der Ballaststoffe überschritten war. Die ausgefallenen Aglykone wurden heiß abfiltriert und dadurch von den anhaftenden Begleitstoffen befreit. Nach einer Wiederholung dieser Manipulation war das Gemisch völlig rein.

3) Trennung der Äther-Petroläther-Ausschüttelung

Zur Trennung verwendeten wir eine 25 cm hohe Perlonsäule mit 3 cm Durchmesser. Sie wurde in der oben beschriebenen Weise

gefüllt, jeweils $\frac{1}{3}$ der Ausschüttelung in 20 ml Methanol gelöst aufgetragen und mit 1,2 l Methanol eluiert. Von den 12 Fraktionen a 100 ml zeigten die ersten beiden eine geringfügige Verunreinigung mit einem blau fluoreszierenden Stoff. Die nächsten 4 enthielten nur Kämpferol. Es folgten 2 Fraktionen mit Gemischen, und in den letzten 4 war nur Quercetin enthalten. Die nächsten drei Versuche auf der nämlichen Säule ergaben die gleiche Verteilung. Es hat sich gezeigt, daß die gleiche Perlonfüllung einer Säule für mehrere gleichartige Trennversuche verwendet werden kann, vorausgesetzt, daß die Extrakte nicht zu stark verunreinigt sind.

4) Reinigung der Ätherausschüttelungen

Die Reinigung dieser Fraktion erzielten wir mittels Perlonsäulen und durch fraktionierte Kristallisation.

Die Ätherausschüttelungen aus dem Extrakt von 2,25 kg Droge nahmen wir in Methanol auf und versetzten mit der gleichen Menge Wasser, worauf wir das Gemisch 8 Tage lang in den Kühlschrank stellten. 0,6 g eines gelben, aus Glykosid 2 und 3 bestehenden Mischkristallisates fielen aus, die wir abfiltrierten.

Zur Reinigung des Gemisches der in den Mutterlaugen verbliebenen Glykoside 1-4 fand eine 25 cm hohe Perlonsäule mit 3 cm Durchmesser Verwendung. Wir gaben die Gesamtmenge der Flavone über die Säule und eluierten mit 1,2 l Methanol. In den ersten 200 ml des Eluates war nur eine blau fluoreszierende Substanz enthalten; es folgen dann Gemische dieser Stoffe mit den Flavonen.

Den gesamten so erhaltenen Extrakt gaben wir nun über eine gleichartige Säule, die wir aber mit 2 l eines aus Methanol und Wasser (1+1) bestehenden Gemisches eluierten. Mit dieser Lösungsmittelzusammenstellung war es möglich, in den ersten 300 ml des Eluates den Rest der blau fluoreszierenden Substanz abzutrennen.

5) Trennung der Ätherausschüttelungen

Zur Trennung dieser Ausschüttelung versuchten wir zuerst Magnesol mit wassergesättigtem Essigester. Wir beschickten die Säule mit 0,06 g unseres Mischkristallisates und eluierten. Es

erfolgte keine Trennung, wie man gemäß den R_F -Werten der Glykoside hätte erwarten müssen, da in diesem System Quercetinglykoside schneller laufen als Kämpferolabkömmlinge. Das tiefersitzende Quercetin-3-arabinosid holt das Kämpferol-3-arabinosid gewissermaßen ein, und beide verlassen gleichzeitig die Säule. Eine 30 cm hohe Zellulosesäule, die wir mit 25% Isopropanol und 75% Wasser eluierten, ergab keine Trennung. Die gleiche Säule mit nur 20% Isopropanol und 80% Wasser entwickelt, führte zum Erfolg. Wegen der geringen Kapazität der Zellulose und der langen Laufzeit dieser Säulen sind wir von diesem System wieder abgegangen.

Die besten Ergebnisse erzielten wir mit einer 35 cm hohen Perlonsäule, deren Durchmesser 4 cm betrug. Das Mischkristallisat lösten wir in 50 ml Methanol und teilten es in 8 Teilmengen auf. Für je 2 Portionen fand die gleiche Säulenfüllung Verwendung. Wir eluierten mit 0,9 l Methanol, das wir nach dem Verlassen der Säule in 10 gleichen Fraktionen von 60 ml auffingen. In den ersten 3 Fraktionen war reines Glykosid 2, in den folgenden 3 befanden sich Gemische, und in den letzten war Glykosid 3 enthalten. Die vereinigten Mischfraktionen gaben wir erneut auf die Säule.

Das Gemisch der Glykoside 1, 2, 3 und 4 bearbeiteten wir auf folgende Weise. Die vorgereinigten Ätherausschüttelungen brachten wir auf eine 30 cm hohe Säule mit einem Durchmesser von 3 cm. Zum Eluieren dienten 2,5 l eines Gemisches aus Methanol und Wasser (1+1). In den ersten zwei Fraktionen von 80 ml war Glykosid 1 enthalten, in den nächsten drei folgte Glykosid 2, anschließend war in einer Fraktion wenig Glykosid 3 enthalten, und in den letzten vier Fraktionen fanden wir ein Gemisch der Glykoside 2 und 4. Dieses Gemisch ließen wir nochmals das gleiche System passieren, wobei in den ersten drei Fraktionen a 80 ml ein Teil von Glykosid 2 abgetrennt wurde. In weiteren fünf Fraktionen waren wieder Gemische enthalten.

Die Glykoside 2 und 4 befreiten wir vom Lösungsmittel, nahmen sie in 30 ml Methanol auf, versetzten mit der gleichen Menge Wasser und stellten bei Zimmertemperatur 4 Tage beiseite. Es fielen 75 mg Glykosid 4 in schönen Kristallen aus. Glykosid 2 war in Lösung geblieben. Von diesem gewannen wir insgesamt 80 mg.

6) Reinigung der Essigester-Ausschüttelung

Diese Ausschüttelung war mit vielen Ballaststoffen versehen. Zuerst gaben wir $\frac{1}{3}$ des Extraktes über eine 7 cm dicke und 40 cm hohe Perlonsäule, die wir mit 5,6 l Methanol eluierten. In den ersten 0,9 l des gefärbten Eluates befand sich ein Teil der blau fluoreszierenden Stoffe. Da aber nach 3maliger Wiederholung noch nicht alle Begleitstoffe entfernt waren, verwendeten wir zur Allgemeinadsorption der Flavone den schwach sauren Kationenaustauscher Permutit C^{*)}. Wegen der relativ geringen Kapazität füllten wir den vorgequollenen Kationenaustauscher in eine 1,2 m hohe Säule mit 9 cm Durchmesser. Die Ausschüttelung nahmen wir in 3 l Wasser auf. Anschließend wurde die Säule mit $\frac{1}{3}$ dieser Lösung beschickt und mit ca. 12 l destilliertem Wasser nachgewaschen bis die ablaufende Flüssigkeit farblos war. Die am Permutit C festgehaltenen Flavone lösten wir jeweils mit 3,5 - 4 l Methanol aus dem Ionenaustauscher. Nach dem Einengen der methanolischen Lösung waren chromatographisch keine Begleitstoffe mehr feststellbar.

7) Versuche zur Trennung der Essigesterausschüttelung

Auf den Chromatogrammen dieser Fraktion in ÄAW, BEW und IAW hatte sich eine gute Differenzierung ergeben. Zur Isolierung präparierten wir eine 45 cm hohe Säule, deren Durchmesser 5 cm betrug, mit Zellulose. Zum Eluieren verwendeten wir wassergesättigten Essigester. Die Chromatogramme der aufgefangenen Fraktionen ergaben in ÄAW eine Auftrennung in 2 Punkte. In IAW aber zeigte es sich, daß jeder dieser Punkte aus 2 Glykosiden bestand. Der erste setzte sich aus Glykosid 5 und 6, der zweite aus Glykosid 6 und 7 zusammen.

Um die Glykosidgemische zu trennen, verlängerten wir die Säule auf 60 cm. Das Ergebnis war nicht besser, weshalb wir die Versuche mit Zellulose einstellten.

Versuche mit Magnesol führten auch zu keinem Erfolg, weshalb wir Perlon als Füllmaterial verwendeten. Zunächst verwandten wir Systeme mit einer Füllhöhe von 40 cm und einem Durchmesser von 3 cm. Zum Eluieren dienten 6,3 l Methanol und Wasser (1+1).

*) Hersteller: Permutit Aktiengesellschaft, Berlin/Düsseldorf

Das bedeutete aber keine Verbesserung der schon mit Zellulose erreichten Ergebnisse. Wenn man Methanol allein zum Eluieren verwendet, erfolgt keine Differenzierung. Wir erhöhten die Füllung der Säule auf etwa 60 cm; aber auch dabei zeigte sich keine Trennung.

Nun variierten wir das Lösungsmittel. Verwendung fand wieder eine 40 cm hohe Säule, die mit einem Gemisch von $1/3$ Methanol und $2/3$ Wasser entwickelt wurde. Mit dieser sehr langsam laufenden Säule konnten wir Glykosid 5 abtrennen. Erst nachdem das System 14 Tage lang täglich 10 Stunden gelaufen war, erschien das erste gefärbte Eluat. Bis zum völligen Entleeren vergingen nochmals 3 Wochen. Insgesamt fanden 12-15 l Lösungsmittel Verwendung. Die Glykoside 6, 7 und 8 verließen die Säule wieder gemeinsam.

Zur Abtrennung des Perlons von Glykosid 5 nahmen wir die Fraktion nach dem Abdampfen des Lösungsmittels in 100 ml kaltem Methanol auf und ließen über Nacht stehen. Das ungelöst am Boden verbleibende Perlon filtrierten wir ab.

Zur Kristallisation brachten wir die methanolische Lösung in eine flache Schale, die offen stehenblieb bis das Methanol verdunstet war. Das Flavon kristallisierte in Zonen am Rand des Gefäßes aus. Zwischen den Kristallen befanden sich die in Streifen abgeschiedenen Begleitstoffe, welche entfernt wurden. Eine Wiederholung dieser Methode führte zu 133 mg kristallinem Glykosid 5.

Bis zu diesem Zeitpunkt stand uns nur Perlon der Firma Bayer zur Verfügung. Zu allen weiteren Versuchen verwendeten wir dann Perlon der Firma BASF (Ultramid K 228 BM 2). Dieses haftet den Flavonen nicht so stark an und scheint eine erhöhte Trennfähigkeit zu besitzen.

Wir setzten mit diesem Produkt unsere Versuche fort, hielten aber die Abmessungen der Säulen bei. Da Glykosid 5 aus dem Gemisch entfernt war, galt es nun, die Glykoside 6, 7 und 8 zu isolieren. Zu diesem Zweck setzten wir eine Perlonsäule an und eluierten mit 7 l eines Gemisches von $1/3$ Methanol und $2/3$ Wasser. In den ersten 0,9 l des Eluates waren geringe Mengen von chromatographisch reinem Glykosid 6 enthalten. Weitere gleichartige Ansätze erbrachten immer etwas Glykosid 6 aber nie reines Glykosid 7.

Wir versuchten jetzt, mit Hilfe der Papierchromatographie eine Trennung zu erzielen. Zu diesem Zweck wurde der Extrakt auf zwanzig 40 cm breite Bogen aufgetragen, die wir in BEW entwickelten. Wir ließen 36 Stunden durchlaufen, bis die Glykoside, die normalerweise eine Steighöhe zwischen R_f 0,3 und 0,6 einnahmen, einen R_f -Wert von 0,9 erreicht hatten. Da die Zonen nicht eindeutig aufgetrennt waren, schnitten wir 3 Streifen aus, die wir von der Front zur Startlinie mit römischen Ziffern benannten. Jeder Streifen wurde mit 4 x 100 ml Äthanol eluiert. Beim Chromatographieren in IAW beobachteten wir in Zone II und III einen Stoff, der bisher in diesem Lösungsmittel von Glykosid 5 verdeckt worden war. Als nächstes suchten wir diese Substanz abzutrennen.

Zu diesem Zweck verwendeten wir kurze Perlonsäulen mit Wasser zum Entwickeln. Schon L. STICH⁵¹⁾ hatten den gleichen Stoff mit der gleichen Methode isoliert. Jede der 3 Fraktionen, die wir durch Papierchromatographie erhalten hatten, gaben wir über eine 12 cm hohe Perlonsäule, deren Durchmesser 3 cm betrug. Mit Wasser konnte das oben erwähnte Glykosid, das wir als Glykosid 8 bezeichnen wollen, leicht abgetrennt werden. Im UV-Licht war deutlich zu beobachten, wie zuerst Glykosid 8 als dunkler Ring vorauslief und dann Glykosid 6 und 7 in größerem Abstand folgten. 2-3 l Wasser wurden jeweils zum Eluieren benötigt.

Auf diese Weise war es möglich, alle in der Pflanze enthaltenen Glykoside und Aglykone zu isolieren.

Außerdem wurden Versuche angesetzt, um die Glykoside 6 und 7 zu reinigen. Wir verwendeten verschiedene Säulensysteme, in denen wir die Lösungsmittel variierten. Auch eine Bleifällung ergab keine Verbesserung. Bei der Hydrolyse zeigten diese Glykoside zusätzlich zu ihren Zuckern immer noch Arabinose und Xylose. Diese beiden Pentosen lassen auf Pflanzenschleime schließen. Damit erklärt sich auch warum die Trennung Schwierigkeiten machte und warum keine endgültige Kristallisation der Glykoside 6 und 7 erreicht wurde.

51) STICH, L.: Dissertation, München 1958

G. Die zur Identifizierung der Flavone durchgeführten Versuche

1) Papierchromatographischer Vergleich mit authentischen Testsubstanzen

Zum papierchromatographischen Vergleich sind die isolierten Substanzen zusammen mit den Vergleichssubstanzen punktförmig auf der Startlinie aufgetragen und in den drei Lösungsmitteln IAW, BEW und AAW entwickelt worden. Als Vergleichssubstanzen verwendeten wir folgende Stoffe: Kämpferol, Quercetin, Kämpferol-3-rhamnosid, Kämpferol-3-arabinosid, Quercetin-3-arabinosid, Kämpferol-7-rhamnosid, Kämpferol-3,7-dirhamnosid, Kämpferol-3-rhamnoglukosid, Rutin und Glykosid I₁ von L. STICH⁵²⁾.

Die R_F-Werte und Fluoreszenzfarben der isolierten Substanzen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

T a b e l l e 7

Substanz	AAW	BEW	IAW	unbesprüht	mit Al ⁺⁺⁺	mit Pb ⁺⁺
Aglykon 1	0,92	0,86	0,38	grüngelb	gelbgrün	gelb
Aglykon 2	0,86	0,62	0,24	grüngelb	gelbgrün	orange
Glykosid 1	0,83	0,79	0,73	braun	gelbgrün	gelb
Glykosid 2	0,79	0,76	0,83	braun	gelbgrün	gelb
Glykosid 3	0,70	0,66	0,74	braun	gelbgrün	orange
Glykosid 4	0,77	0,73	0,53	gelb	grüngelb	grüngelb
Glykosid 5	0,58	0,57	0,81	braun	gelbgrün	gelb
Glykosid 6	0,46	0,47	0,71	braun	gelbgrün	gelb
Glykosid 7	0,35	0,34	0,67	braun	gelbgrün	orange
Glykosid 8	0,35	0,34	0,83	braun	dunkel	dunkel

2) Schmelz- und Mischschmelzpunkte

Alle Schmelz- und Mischschmelzpunkte, die auf dem Mikroschmelzpunktsapparat nach Kofler bestimmt wurden, sind korrigiert.

52) STICH, L.: Dissertation, München 1958

3) Reduktionsteste

1 ml einer 10^{-3} molaren Lösung unserer Glykoside versetzten wir mit etwa 10 mg Zink oder Magnesium und gaben dann unter Kühlung 3-5 Tropfen Salzsäure zu. Die roten Farbänderungen beobachteten wir sofort und dann nochmals nach 10 Minuten. Mit Zink werden lediglich Flavonole und Flavonol-3-glykoside zu gefärbten Verbindungen reduziert, während durch Magnesium alle Flavonverbindungen in farbige Produkte übergeführt werden. Der Unterschied ist allerdings mehr gradueller Natur. Eine Einordnung der Substanzen auf Grund dieses Tests ist deshalb nicht ganz einfach.

4) Eisenchloridreaktion

Die Eisenchloridreaktion führten wir wegen der geringen Substanzmengen auf dem Papier durch. Zu diesem Zweck sind unsere Glykoside jeweils neben den zugehörigen Testsubstanzen aufgetragen worden. Nach dem Entwickeln besprühten wir mit einer 0,1%igen wässrigen Ferrichloridlösung, wobei grüne bis schmutzigrüne Färbungen auftraten.

5) Zirkon-Zitronensäure-Test

Diesen Test führten wir nach den gleichen Vorbereitungen wie unter 4) beschrieben auf dem Chromatogramm durch. Als Reagenzien benötigten wir:

1. Methanolische Zirkonoxychloridlösung 2%
2. Wässrige Zitronensäurelösung 5%
3. Salzsäure 25%.

Zuerst besprühten wir das Chromatogramm mit der Zirkonoxychloridlösung und beobachteten sofort unter der UV-Lampe die auftretenden Fluoreszenzfarben. Die getrockneten Bogen behandelten wir zweimal mit der frisch bereiteten Zitronensäurelösung. Die Flecken derjenigen Flavonoidverbindungen, die am C-3-Atom eine freie OH-Gruppe trugen, fluoreszierten gelb. Waren die Flecken gelöscht, so wurden sie 2 Minuten warmen Salzsäurenebeln ausgesetzt, wobei Flavonol-3-glykoside zu Flavonolen hydrolysierten und damit die Fluoreszenz erneut auftrat.

6) UV-absorptionsspektrophotometrische Untersuchungen

Alle UV-Absorptionsspektren haben wir mit dem Zeiss-Opton-Spektralphotometer M 4 Q bei einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Für die Messungen verwendeten wir Konzentrationen zwischen 10 und 50 mg pro Liter Methanol p.a.

Sämtliche isolierten Glykoside, sowie deren Aglykone, sind auf diese Weise gemessen worden. In der folgenden Tabelle 8 sind die Maxima dieser Verbindungen zusammengefaßt.

T a b e l l e 8

Substanz	Glykoside			zugehörige Aglykone	
	Max _I mμ	Max _{II} mμ	Max _{III} mμ	Max _I mμ	Max _{II} mμ
Aglykon 1				267	365
Aglykon 2				255	370
Glykosid 1	265	345		267	365
Glykosid 2	265	348		267	365
Glykosid 3	255	355		255	370
Glykosid 4	265	365	252	267	365
Glykosid 5	265	343		267	365
Glykosid 6	265	350		267	365
Glykosid 7	255	358		255	370
Glykosid 8	272	325	350		
Hauptglykosid aus Fol.Pruni spinosae	265	243		257	365

Neben diesen Messungen sind Untersuchungen über den Einfluß von Natriumazetat auf die Maxima vorgenommen worden. Insbesondere suchten wir die Zuckerstellung bei den Glykosiden 4 und 5 zu ermitteln, wobei es zu entscheiden galt, ob es sich um C-7- oder um C-4'- bzw. um C-3,7- oder um C-3,4'-Glykoside handelt. Nach den Arbeiten von T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER⁵³⁾ deutet eine kleine Verschiebung des zweiten Maximums auf eine C-7-Verglykosidierung hin.

53) GEISSMAN, T.A. u. KRANEN-FIEDLER, U.: Naturwissenschaften 43, 226 (1956)

Für die Glykoside 2, 4, 5 und für das Hauptglykosid aus Folia Pruni spinosae ist der spezifische Extinktionskoeffizient festgestellt worden. Er errechnet sich nach der Formel

$E_{\text{spez.}} = \frac{E_{\text{gemessen}}}{c \cdot d}$; c bedeutet die Konzentration in g/l und d die Schichtdicke in cm.

Zur Messung im Natriumazetatmilieu wurden jeweils 1-3 mg des Glykosides in 100 ml Methanol p.a. gelöst. 5 ml der Stammlösung schüttelten wir 3 Minuten mit einem Überschuß von frisch geschmolzenem Natriumazetat p.a. Anschließend ließen wir 15 Minuten stehen und führten sofort nach dem Filtrieren die Messung bei einer Schichtdicke von 1 cm durch. In der folgenden Tabelle 9 sind die Werte der Maximaverschiebungen im Natriumazetatmilieu zusammengestellt.

T a b e l l e 9

Glykosid	Methanol		Methanol + Natriumazetat		Verschiebung der Maxima	
	Max _I m μ	Max _{II} m μ	Max _I m μ	Max _{II} m μ	Max _I m μ	Max _{II} m μ
Kämpferol-7-rhamnosid aus Robinin	265	365	265	380	0	15
Kämpferol-7-rhamnosid aus Glykosid 5	265	365	265	380	0	15
Kämpferol-7-rhamnosid aus Hauptglykosid B (Richthammer)	265	365	265	380	0	15
Glykosid 4	265	365	265	380	0	15
Glykosid A (Richthammer)	265	365	265	380	0	15
Glykosid 5	265	343	265	350	0	7
Hauptglykosid aus Folia Pruni spinosae	265	343	265	350	0	7

Vergleichende Messungen dieser Glykoside mit Natriumazetat-Borsäure und Natriumazetat-Aluminiumchlorid hat N. GROLL⁵⁴⁾ durchgeführt.

7) Reaktion mit Echtblausalz B "Bayer"

Zum Beweis der C-7-Verglykosidierung einiger Flavone zogen wir die von R. NEU⁵⁵⁾⁵⁶⁾ angegebene Reaktion mit Diazoniumverbindungen heran. Wir besprühten unsere Substanzen auf dem Chromatogramm mit einer 2%igen, wäßrigen Echtblausalzlösung B "Bayer" und beobachteten die Reaktion nach dem Trocknen. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 10 zusammengestellt.

T a b e l l e 10

Substanzen	Zuckerstellung	Farbe
A) <u>Vergleichssubstanzen:</u>		
Rutin	C-3	rotviolett
Kämpferol-3-rhamnosid	C-3	rotviolett
Spiraeosid	C-4'	rotviolett
Hesperidin	C-7	farblos
Kämpferol-7-rhamnosid aus Robinin	C-7	farblos
B) <u>Eigene Substanzen:</u>		
Glykosid 5		farblos
Hauptglykosid aus Folia Pruni spinosae		farblos
Glykosid 4		farblos
Glykosid A (von F. Richthammer)		farblos
Kämpferol-7-rhamnosid aus part. Hydrolyse von Glykosid 5		farblos
Kämpferol-7-rhamnosid aus part. Hydrolyse des Hauptglykosides aus Folia Pruni spinosae		farblos

54) GROLL, N.: Dissertation, München 1959

55) NEU, R.: Z.analyt.Chem. 151, 321 (1956)

56) NEU, R.: Mikrochim.Acta 196, (1957)

Die Resultate der Reaktionen mit Echtblausalz B "Bayer" und die Verschiebungen im Natriumazetatmilieu zeigen, daß es sich bei den untersuchten Glykosiden um Kämpferol-7- bzw. um Kämpferol-3,7-Verbindungen handelt.

8) Methylierung von Glykosid 5 und des Hauptglykosides aus den Blättern von *Prunus spinosa* L.

Wir lösten je 100 mg der Glykoside mit 75 ml Azeton p.a., setzten 2 g wasserfreies Kaliumkarbonat und 2 ml Dimethylsulfat zu. Nach 1stündigem Schütteln hielten wir das Gemisch am Rückflußkühler 30 Stunden in schwachem Sieden. Nach dem Abkühlen wurde die Azetonlösung abfiltriert und der Kolben 2mal mit 30 ml Azeton nachgespült. Nach Zusatz von 20 ml Wasser dampften wir das Azeton vorsichtig ab. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und 1 Stunde mit 1%iger Salzsäure hydrolysiert. Das ausgefallene Hydrolyseprodukt nutschten wir ab, wuschen es mit Wasser gründlich aus, lösten es in 20 ml Methanol und setzten etwa 5 ml Wasser zu. Nach einigen Tagen war ein Niederschlag ausgefallen, den wir erneut so behandelten. Nach 5maligem Umkristallisieren erreichten wir einen Schmelzpunkt von $293-295^{\circ}$ C.

9) CH-Bestimmungen

Die CH-Bestimmungen der Aglykone 1 und 2, sowie der Glykoside 2, 4 und 5 und des Hauptglykosides aus den Blättern von *Prunus spinosa* L. sind vom Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt worden.

10) Infrarotspektren

Infrarotspektren ließen wir von den Glykosiden 2, 4, 5 und vom Hauptglykosid aus den Blättern von *Prunus spinosa* L. anfertigen. Die im Hochvakuum getrockneten Flavone wurden genau gewogen (350 - 1200 γ), mit ca. 300 mg Kaliumbromid gemischt und im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 gemessen.

H. Hydrolysen

1) Qualitative Hydrolysen

Bei den Glykosiden 1 und 3 führten wir eine qualitative Hydrolyse durch. Bei Glykosid 1 hydrolysierten wir 1 Stunde lang am siedenden Wasserbad mit 10 ml 2,5%iger Salzsäure, bei Glykosid 3 verwendeten wir 1%ige Schwefelsäure (10 ml) unter den gleichen Bedingungen. Die mit Äther ausgeschüttelten Aglykone chromatographierten wir in IAW. Der saure Hydrolyserückstand wurde nach dem Neutralisieren und Einengen auf 0,5 ml auf Zucker untersucht.

2) Quantitative Hydrolysen

Zur Bestimmung des Verhältnisses der Zucker zu den Aglykonen zogen wir die quantitative Hydrolyse heran. Von den Glykosiden 2, 4, 5, 6 und 7 wurde eine bestimmte Menge genau abgewogen. Im Trockenschrank trockneten wir bei 110° C bis zur Gewichtskonstanz. Zur Hydrolyse verwendeten wir bevorzugt 2,5%ige Salzsäure, die wir 1 Stunde auf dem Drahtnetz und dem Tondreieck zu gelindem Sieden erhitzten. Die ausgefallenen Aglykone filtrierten wir nach 24stündigem Einstellen in den Kühlschrank mit einer gewogenen Mikrofiltrernutsche G3 ab. Nach dem Auswaschen mit Wasser und erneutem Trocknen bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz bestimmten wir das Gewicht des Aglykons. Die folgende Tabelle 11 gibt eine Zusammenstellung der eingesetzten Glykosidmengen und deren Aglykone.

T a b e l l e 11

Glykosid	hydrolysiert mit	Einwaage mg	gefundene Menge	Aglykon
2	10 ml HCl 2,5%	25,0 mg	17,5 mg	70,0%
4	10 ml HCl 2,5%	21,0 mg	13,4 mg	63,8%
5	10 ml HCl 2,5%	27,5 mg	11,9 mg	43,2%
6	10 ml HCl 2,5%	14,5 mg	5,5 mg	38,0%
7	10 ml HCl 2,5%	24,5 mg	9,8 mg	40,0%
Hauptgl. aus Fol. Prun.spin.	10 ml HCl 2,0%	28,6 mg	11,7 mg	41,0%

3) Partielle Hydrolysen in Cyclohexanol-Ameisensäure

Zur Klärung der Zuckerstellung unterwarfen wir Glykosid 5 und das Hauptglykosid aus *Folia Pruni spinosae* der partiellen Hydrolyse nach D. W. FOX, W. L. SAVAGE und S. H. WENDER⁵⁷⁾. Zu diesem Zweck lösten wir von ersterem Glykosid 17 mg und von letzterem 20 mg in 3 ml Cyclohexanol unter Erwärmen auf dem Wasserbad und setzten anschließend 0,5 ml 98%ige Ameisensäure zu. Die Lösung hielten wir 9 Stunden am Rückflußkühler in gelindem Sieden.

Das Chromatogramm der Hydrolysen der beiden Glykoside ergab in IAW übereinstimmend 4 Punkte. In den Lösungsmitteln BEW und ÄAW konnten diese durch Mitlaufen von Testsubstanzen als Kämpferol, Kämpferol-3,7-dirhamnosid, Kämpferol-3-rhamnosid und Kämpferol-7-rhamnosid ermittelt werden. Die drei letzteren isolierten wir mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie. Die gesamte Hydrolyse brachten wir auf 3 Chromatogrammbogen von 40 cm Breite und entwickelten in IAW. Durch chromatographischen Vergleich, durch Isolierung, durch Hydrolysen der Spaltprodukte und Messen der Maxima konnten die oben genannten Monoglykoside eindeutig identifiziert werden.

4) Hydrolysemethoden zur Bearbeitung des Hauptglykosides aus den Blättern von *Prunus spinosa* L.

Das von F. RICHTHAMMER⁵⁸⁾ aus den Blättern von *Prunus spinosa* L. isolierte Glykosid B hydrolysierten wir durch 1stündiges Erhitzen auf dem siedenden Wasserbad mit jeweils 10 ml einer 2,5- und 10%igen Salzsäure. Die Hydrolysen zeigen, was Zucker und Aglykon anbelangt, immer das gleiche Ergebnis.

Wir isolierten das Hauptglykosid aus den Blättern von *Folia Pruni spinosae* nach und unterwarfen es einer Hydrolyse mit verschiedenen Methoden. Zuerst lösten wir 21 mg der Verbindung in 1 ml Methanol und erhitzen 1 Stunde mit 10 ml 1%iger Salzsäure. Das Chromatogramm in IAW zeigte eine quantitative Spaltung. Eine zweite Hydrolyse führten wir mit 10 ml 2%iger Schwefelsäure durch. Die Chromatogramme ergaben die gleichen Zucker und Aglykone.

57) FOX, D.W., SAVAGE, W.L. u. WENDER, S.H.: J.Amer.chem.Soc. 75, 2504 (1953)

58) RICHTHAMMER, F.: Dissertation, München 1955

I. Identifizierung der Aglykone

1) Papierchromatographischer Vergleich

Diese Vergleiche waren bei unserer Arbeit besonders bei den systematischen Untersuchungen der Rosaceen von Bedeutung. Die Hydrolysen der Pflanzenextrakte verglichen wir in den drei Fließmitteln BEW, ÄAW und IAW, wovon das letztere für die Aglykone das geeignetste war. Zur Identifizierung der Aglykone aus den Pflanzenextrakten und den Isolierungen sind die in Tabelle 12 angegebenen Testsubstanzen zum Vergleich herangezogen worden. Außerdem sind in der Tabelle die R_f -Werte und Fluoreszenzfarben der Aglykonanteile unserer Glykoside enthalten.

T a b e l l e 12

Substanz	ÄAW	BEW	IAW	unbesprüht	mit Al***	mit Pb**
Aglykone 1, 2, 4, 5, 6	0,91	0,80	0,26	gelb	grüngelb	grüngelb
Kämpferol	0,91	0,80	0,26	gelb	grüngelb	grüngelb
Aglykone 3,7	0,79	0,66	0,19	gelb	grüngelb	orange
Quercetin	0,79	0,66	0,19	gelb	grüngelb	orange
Kämpferid	0,93	0,83	0,32	gelb	grüngelb	grüngelb
Isorhamnetin	0,85	0,72	0,24	gelb	grüngelb	grüngelb
Apigenin	0,94	0,81	0,37	dunkelbraun	gelb	gelb
Luteolin	0,83	0,69	0,28	dunkelbraun	gelb	ocker

2) UV-Spektren der Aglykone

Die UV-Spektren der Aglykone wurden in der auf Seite 60 beschriebenen Weise aufgenommen. Die Maxima derselben sind in Tabelle 8 auf Seite 60 zusammengestellt. Die Maxima der Aglykone von Glykosid 1, 2, 4, 5 und 6 stimmen mit denen von Kämpferol überein, während die Aglykone von Glykosid 3 und 7 mit Quercetin identisch sind.

3) Azetylierungen

Die Aglykone der Glykoside 2, 4, 5, 6 und 7 azetylierten wir. Außerdem stellten wir von den beiden aus der Pflanze isolierten Aglykonen die Azetylprodukte dar. Letztere azetylierten wir nach der von F. RICHTHAMMER⁵⁹⁾ beschriebenen Methode mit 10 ml Essigsäureanhydrid, 0,2 g frisch geschmolzenem Natriumazetat p.a. und 10 Tropfen Pyridin. Nach dem Abkühlen setzten wir 50 ml Wasser zu.

Unseren weiteren Versuchen legten wir die von L. STICH⁶⁰⁾ angegebenen Mengenverhältnisse zu Grunde. Wir arbeiteten mit 0,2 g Natriumazetat, 5 ml Essigsäureanhydrid und 5 Tropfen Pyridin. Nach Zusatz von 3 - 30 mg Substanz wurde 2 Stunden am Rückflußkühler erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Wir setzten 10 ml Wasser zu, stellten kühl und konnten dann nach 3 Stunden das Azetat abfiltrieren. Dieses kristallisierten wir zweimal aus heißem Äthanol um. Es hat sich herausgestellt, daß die zweite Methode günstiger ist, weil aus dem Gemisch nach Zusatz von Wasser größere und schönere Kristalle ausfallen.

In der folgenden Tabelle 13 sind die Schmelzpunkte der Aglykone und deren Azetate den Werten der entsprechenden Testsubstanzen gegenübergestellt.

T a b e l l e 13

Substanz	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt der Azetylprodukte
Kämpferol	270 - 272° C	179 - 181° C
Aglykone 2, 4, 5, 6	269 - 273° C	178 - 182° C
Quercetin	299 - 301° C	188 - 190° C
Aglykon 7	300 - 303° C	188 - 191° C
Aglykon 1 (aus der Pflanze)	270 - 271° C	178 - 181° C
Aglykon 2 (aus der Pflanze)	299 - 301° C	188 - 190° C
Aglykon des Hauptglyk. aus Folia Pruni spinosae	270 - 272° C	179 - 181° C

59) RICHTHAMMER, F.: Dissertation, München 1956

60) STICH, L.: Dissertation, München 1958

4) Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte

Alle Schmelz- und Mischschmelzpunkte bestimmten wir auf der Mikroschmelzpunktsapparatur nach Kofler. Die Werte sind korrigiert. Bei sämtlichen Aglykonen und deren Azetylprodukten führten wir die Mischschmelzpunkte mit authentischen Testsubstanzen durch. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 13 (S. 66) zusammengestellt.

K. Versuche zur Identifizierung der Zuckerkomponenten

1) Neutralisation der Hydrolyseflüssigkeiten einschließlich des Hauptglykosides aus Folia Pruni spinosae

Die sauren Hydrolyseflüssigkeiten wurden mit dem Ionenaustauscher Dowex 2 neutralisiert. Zu diesem Zweck wird das grobe Pulver (50 - 100 g) in einer Glassäule mit destilliertem Wasser angeschwemmt. Bei erstmaliger Benutzung ist eine Reinigung mit etwa 500 ml 1/10 n NaOH und anschließend mit 500 ml 1/10 n HCl erforderlich. Die Säule wird dann mit destilliertem Wasser nachgewaschen und anschließend mit 70%igem Äthanol entwässert. Hierauf behandelt man mit 70%iger gesättigter äthanolischer Natriumbikarbonatlösung bis zur alkalischen Reaktion. Zum Schluß wird die Säule mit 70%igem Äthanol neutral gewaschen.

Mit dem so aktivierten Dowex ist es möglich, die sauren Zuckerklösungen zu neutralisieren. Die saure Lösung gibt man bei einer Tropfgeschwindigkeit von 20 - 40 Tropfen pro Minute über die Säule. Mit dem auf 0,5 ml eingeeengten Eluat können Chromatogramme und Osazone bereitet werden.

Bei der Nacharbeitung des von F. Richthammer aus Folia Pruni spinosae isolierten Hauptglykosides hatten sich Widersprüche bei den Zuckern ergeben. Da die Vermutung aufgetaucht war, daß es sich um Verunreinigungen oder um Spaltprodukte aus dem Dowex handeln könnte, war es zweckmäßig, bei der Neutralisation den Ionenaustauscher zu umgehen. Wir hydrolysierten deshalb 21 mg des nachisolierten Hauptglykosides aus den Blättern von Prunus spinosa mit

Salzsäure. Nach Abfiltrieren des Aglykons füllten wir die saure Lösung der Zucker auf 15 ml auf und teilten diese in 3 Teile à 5 ml. Die 3 Partien wurden auf verschiedene Weise neutralisiert und in gleicher Weise chromatographiert.

Den ersten Teil der salzsauren Lösung neutralisierten wir mit Barytwasser. Mit "Merck" Indikatorpapier stellten wir auf p_H 7 ein. Nach dem Einengen war in der Lösung Bariumchlorid enthalten, was aber keinen starken Einfluß auf die Chromatogramme ausübte. Wir beobachteten lediglich eine kleine R_F -Depression. Das zweite Drittel neutralisierten wir durch einen Überschuß an Silberoxyd. Das schwarze Silberoxyd geht dabei in weißes Silberchlorid über. Nach dem Abfiltrieren des Silberchlorids und des überschüssigen Silberoxyds konnte das eingeeengte Filtrat direkt chromatographiert werden. Den Rest der Lösung behandelten wir in üblicher Weise mit Dowex 2.

Alle drei Methoden brachten die gleichen Ergebnisse. Bei der ersten und dritten Partie zeigte sich auf dem Chromatogramm eine geringfügige Schwanzbildung.

Zur Überprüfung der Ergebnisse hydrolysierten wir das Glykosid mit Schwefelsäure und neutralisierten mit Barytwasser. Ganz eindeutig ist auch hier, wie bei den oben beschriebenen Arbeitsgängen, R h a m n o s e als einziger Zucker des Glykosides gefunden worden.

2) Papierchromatographischer Vergleich der Zucker

Die aufgetragenen Zucker wurden in PÄW entwickelt. Nach dem Trocknen besprühten wir mit Anilinphthalatlösung. (Anilin 0,93 g, o-Phthalsäure 1,66 g, wassergesättigtes Butanol ad 100 ml). Das noch feuchte Chromatogramm trockneten wir sofort 10 Minuten lang im Trockenschrank bei 105-110° C. Die roten bzw. braunen Flecken waren mit bloßem Auge zu erkennen. Als Vergleichssubstanzen zogen wir Rhamnose, Arabinose, Glukose und Xylose heran. In Tabelle 14 auf Seite 69 sind die R_F -Werte der gefundenen Zucker in PÄW zusammen mit den Werten der Testsubstanzen aufgeführt.

T a b e l l e 14

Substanz	R_f -Werte in PÄW von			
	Zucker 1	Zucker 2	Zucker 3	Zucker 4
Rhamnose	0,60			
Xylose		0,53		
Arabinose			0,49	
Glukose				0,46
Glykosid 1	0,60			
Glykosid 2			0,49	
Glykosid 3			0,49	
Glykosid 4	0,60			
Glykosid 5	0,60			
Glykosid 6	0,60	0,53	0,49	0,46
Glykosid 7	0,60	0,53	0,49	0,46
Hauptglykosid aus Fol.Pruni spinosae	0,60			
Mutterlaugen dieses Glykosids	0,60	0,53	0,49	

Die der Rhamnose und Glukose zugeordneten Punkte waren nach dem Besprühen braun, die anderen rot. Bei den Glykosiden 6 und 7 ebenso wie in der Mutterlauge des Hauptglykosides aus Folia Pruni spinosae traten zusätzlich als Zucker Arabinose und Xylose auf, was auf einen Pflanzenschleim zurückzuführen sein dürfte.

3) Darstellung, Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt der Osazone

Die auf 0,5 ml eingeeengte Zuckerlösung versetzten wir im Reagenzglas mit einer frisch bereiteten Lösung (0,5 ml) von Phenylhydrazinhydrochlorid (1 g Phenylhydrazinhydrochlorid, 1,5 g Natriumazetat p.a., Aqua dest. ad 10 ml). Das Glas stellten wir 1 Stunde in das siedende Wasserbad. Nach dem Herausnehmen warteten wir 1/4 - 1/2 Stunde und nahmen dann die ersten ausgefallenen Kristalle heraus, die meist schmelzpunktsrein waren. Den Rest filtrierten wir

nach 12 Stunden ab, wuschen mit Wasser aus und kristallisierten ihn aus 96%igem Äthanol um.

Von den Osazonen führten wir jeweils den Schmelzpunkt und den Mischschmelzpunkt mit authentischem Osazon auf der Mikroschmelzpunktsapparatur nach Kofler aus. Die Werte sind korrigiert. Nachstehende Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Schmelzpunkte der Osazone und deren Testsubstanzen.

T a b e l l e 15

Substanz	Schmelzpunkte der Osazone
Arabinoseosazon	158 - 160° C
Glykosid 2	158 - 160° C
Rhamnoseosazon	179 - 181° C
Glykosid 4	179 - 182° C
Glykosid 5	179 - 182° C
Hauptglykosid aus Folia Pruni spinosae	179 - 181° C

L. Vereinfachte Isolierung des Hauptglykosides aus Folia

Pruni spinosae

Da das von F. Richthammer isolierte Glykosid infolge von Verunreinigungen keine eindeutige Aussage über die Zucker zuließ, ist das Glykosid von uns nachisoliert worden. Grundsätzlich hielten wir die von F. Richthammer angegebenen Richtlinien bei. Eine Vereinfachung erzielten wir aber durch Weglassen der Vorextraktionen. Durch Verdünnen mit Wasser war es möglich, viele Begleitstoffe zu entfernen. Im einzelnen wurde die Isolierung auf folgende Art vorgenommen.

Im Juni 1958 sammelten wir in der Umgebung von Langquaid 6 kg frische Schlehenblätter. Nach Lufttrocknung brachten wir sie 1/2 Stunde bei 80° C in den Trockenschrank. Es ergaben sich 900 g Trockendroge.

800 g davon extrahierten wir im Soxhlet mit Methanol, destillierten das Lösungsmittel ab und nahmen den Rückstand in 750 ml Wasser auf. Wir erhielten eine gelatinisierende Masse, die mit der gleichen Menge Chloroform emulgiert wurde. Durch Zerstören der Emulsion wurden die Begleitstoffe abgeschieden, und wir bekamen eine klar filtrierbare Flüssigkeit. Die wäßrige Lösung stellten wir über Nacht in den Kühlschrank, nachdem wir sie vorher auf 2 l verdünnt hatten. Am nächsten Tag war eine große Menge einer dunklen amorphen Masse ausgefallen, die wir abfiltrierten.

Im Anschluß daran engten wir auf 250 ml ein und schüttelten 30mal mit 250 ml Äther aus. Dabei wurden hauptsächlich Kämpferol, Quercetin, Kämpferol-7-rhamnosid und nur wenig Hauptglykosid erfaßt.

Nach der Behandlung mit Äther schüttelten wir 20mal mit 250 ml Essigester aus. Die vereinigten Essigester-Fractionen wurden auf 150 ml eingengt und 4 Wochen lang im Kühlschrank aufbewahrt. Gleichzeitig war der wäßrige Extrakt zur Sirupdicke eingengt und ebenfalls in den Kühlschrank verbracht worden. Nach 4 Wochen konnte in beiden Flüssigkeiten eine starke Abscheidung des Hauptglykosides beobachtet werden. Wir filtrierten diese ab und vereinigten sie mit der ersten Abscheidung.

Die vereinigten Glykosidfraktionen konnten durch Waschen mit 100 ml Wasser und anschließend mit 10 ml Methanol weitgehend gereinigt werden. Es ergab sich ein fast weißes Glykosid, das noch 3mal aus Methanol-Wasser umkristallisiert wurde. Als Ausbeute erhielten wir 1,1 g reine, kristalline Substanz.

M. Sprühreagenzien zur Charakterisierung der im UV-Licht blau
fluoreszierenden Stoffe

Wir ließen Ammoniakdämpfe auf unsere Substanzen einwirken, indem wir ein mit 25%igem Ammoniak gefülltes Weithalsglas 2 Min. lang unter dem Chromatogramm bewegten.

Ein in BEW entwickeltes Chromatogramm unserer Stoffe besprühten wir mit 2n KOH in methanolischer Lösung (ca. 1,1 g/100 ml). Nach dem Trocknen wurden die im UV-Licht auftretenden Fluoreszenzfarben beobachtet.

Außerdem arbeiteten wir mit folgendem Diazoreagens:

- | | |
|------------------------|----------------------------|
| A) Natriumnitrit 0,5 g | B) Natriumsulfanilat 0,8 g |
| Aqua dest. ad 250 ml | Aqua dest. 245 ml |
| | Salzsäure (37%) 5 ml. |

Zuerst besprühten wir das Chromatogramm mit 2n KOH in methanolischer Lösung und trockneten es bei 100° C im Trockenschrank. Nun wurden die Lösungen A) und B) zu gleichen Teilen gemischt und das vorbehandelte Chromatogramm besprüht. Die auftretenden Farben beobachteten wir am noch feuchten Chromatogramm.

Lebenslauf

Am 29.6.1931 wurde ich, Karl Andreas August Fuchs, als Sohn des Apothekers Karl Fuchs und seiner Ehefrau Berta, geb. Groß, in Burgheim bei Neuburg an der Donau geboren.

1934 übersiedelten meine Eltern nach Langquaid bei Eggmühl. Dort besuchte ich die ersten vier Klassen der Volksschule. An Ostern 1941 trat ich in das Alte Gymnasium in Regensburg ein, wo ich im Juni 1951 die Reifeprüfung ablegte.

Meine zweijährige Praktikantenzeit absolvierte ich in der elterlichen Apotheke in Langquaid. Das pharmazeutische Vorexamen bestand ich im September 1953 in Regensburg.

Im Wintersemester 1953/54 nahm ich an der Universität München das Studium der Pharmazie auf und legte nach sechs Semestern das Staatsexamen ab.

Im Januar 1957 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmazeutische Arzneimittel-lehre der Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer.

